

## ⑫ 公表特許公報 (A)

平3-503759

⑬ 公表 平成3年(1991)8月22日

⑭ Int. Cl.<sup>5</sup>  
A 61 K 37/02識別記号  
ADU  
ABB  
ADZ庁内整理番号  
8615-4C審査請求 未請求  
予備審査請求 有

部門 (区分) 3 (2)

※

(全 26 頁)

⑮ 発明の名称 ポリマーとコロニー刺激因子-1との接合体

⑯ 待 願 平1-502482

⑰ 出 願 平1(1989)1月23日

⑱ 翻訳文提出日 平2(1990)7月20日

⑲ 国際出願 PCT/US89/00270

⑳ 国際公開番号 WO89/06546

㉑ 国際公開日 平1(1989)7月27日

優先権主張 ㉒ 1988年1月20日 ㉓ 米国 (U S) ㉔ 146,275

⑳ 発 明 者 シヤドル, ボーラ ジエイ,

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94805, リッチモンド, マクドナルド アベニュー 5110

㉑ 出 願 人 シタス コーポレーション

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94608, エミリービル, ファイフティースード ストリート 1400

㉒ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外 4 名

㉓ 指 定 国 AT (広域特許), AU, BE (広域特許), BG, BR, CH (広域特許), DE (広域特許), DK, FI, FR (広域特許), GB (広域特許), HU, IT (広域特許), JP, KR, LK, LU (広域特許), NL (広域特許), NO, RO, SE (広域特許), SU, US

最終頁に続く

## 特許 (内容に変更なし)

## 請求の範囲

1. 蛋白質を含んで成る生物学的に活性な組成物であって、該蛋白質はインビトロコロニー刺激因子-1 (CSF-1) 測定において一次マクロファージコロニーの形成を刺激し、そして該蛋白質はポリエチレン又はポリプロピレングリコールホモポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、及びポリビニルアルコールから成る群から選択された水溶性ポリマーに共有結合により接合しており、ここで前記ホモポリマーは一端においてアルキル基により置換されているか又は置換されていない、ことを特徴とする前記組成物。

2. 前記蛋白質が生来のヒト CSF-1 である請求項1に記載の組成物。

3. 前記蛋白質が組換えヒト CSF-1 である請求項1に記載の組成物。

4. 前記蛋白質が細菌中で組換え発現されたものであり、そして LCSF/CV150 ないし CV464;  $\text{tyr}_{55}\text{LCSF}/\text{CV150}$  ないし CV464;  $\text{SCSF}/\text{CV150}$  ないし CV166;  $\text{asp}_{55}\text{SCSF}/\text{CV150}$  ないし CV166; 並びにこれらの  $\text{glu}_{55}$  ミューテイン及び N $\nabla$ 3 及び N $\nabla$ 3 ミューテインから成る群から選択された予想アミノ酸配列を有するホモダイマーであり、ここで LCSF は第2図の アミノ酸 1-522 として示される配列によりコードされており、そして SCSF は第1図の アミノ酸 1-224 として示される配列によりコードされている、請求項3に記載の組成物。

5. 前記蛋白質が、 $\text{LCSF}/\text{CV150}$ ;  $\text{tyr}_{55}\text{LCSF}/\text{CV150}$ ;

$\text{LCSF}/\text{CV190}$ ;  $\text{tyr}_{55}\text{LCSF}/\text{CV190}$ ;  $\text{LCSF}/\text{CV191}$ ;  $\text{tyr}_{55}\text{LCSF}/\text{CV191}$ ;  $\text{LCSF}/\text{CV221}$ ;  $\text{tyr}_{55}\text{LCSF}/\text{CV221}$ ;  $\text{LCSF}/\text{CV223}$ ;  $\text{tyr}_{55}\text{LCSF}/\text{CV223}$ ;  $\text{LCSF}/\text{CV236}$ ;  $\text{tyr}_{55}\text{LCSF}/\text{CV236}$ ;  $\text{LCSF}/\text{CV238}$ ;  $\text{tyr}_{55}\text{LCSF}/\text{CV238}$ ;  $\text{LCSF}/\text{CV249}$ ;  $\text{tyr}_{55}\text{LCSF}/\text{CV249}$ ;  $\text{LCSF}/\text{CV258}$ ;  $\text{tyr}_{55}\text{LCSF}/\text{CV258}$ ;  $\text{LCSF}/\text{CV411}$ ;  $\text{tyr}_{55}\text{LCSF}/\text{CV411}$ ;  $\text{LCSF}/\text{CV464}$ ;  $\text{tyr}_{55}\text{LCSF}/\text{CV464}$ ;  $\text{SCSF}/\text{CV150}$ ;  $\text{SCSF}/\text{CV153}$ ;  $\text{SCSF}/\text{CV158}$ ; 対応する  $\text{asp}_{55}\text{SCSF}$ ; 並びにその  $\text{glu}_{55}$  ミューテイン及び N $\nabla$ 2 及び N $\nabla$ 3 ミューテインから成る群から選択される予想アミノ酸配列を有するホモダイマーである、請求項4に記載の組成物。

6. 前記蛋白質が、 $\text{LCSF}/\text{CV150}$ ,  $\text{LCSF}/\text{CV190}$ ,  $\text{LCSF}/\text{CV221}$ ,  $\text{tyr}_{55}\text{LCSF}/\text{CV150}$ ,  $\text{tyr}_{55}\text{LCSF}/\text{CV190}$ ,  $\text{tyr}_{55}\text{LCSF}/\text{CV221}$ ,  $\text{SCSF}/\text{CV158}$ ,  $\text{SCSF}/\text{CV150}$ ,  $\text{asp}_{55}\text{SCSF}/\text{CV158}$ ;  $\text{asp}_{55}\text{SCSF}/\text{CV150}$ ; 並びにその N $\nabla$ 2 及び N $\nabla$ 3 ミューテインから成る群から選ばれた配列によりコードされたホモダイマーである、請求項5に記載の組成物。

7. 前記蛋白質が、 $\text{SCSF}/\text{CV150}$ ,  $\text{asp}_{55}\text{SCSF}/\text{CV150}$ ,  $\text{SCSF}/\text{N}\nabla 3\text{CV150}$ ,  $\text{asp}_{55}\text{SCSF}/\text{N}\nabla 3\text{CV150}$ ,  $\text{SCSF}/\text{N}\nabla 3\text{CV158}$ ,  $\text{asp}_{55}\text{SCSF}/\text{N}\nabla 3\text{CV158}$ ,  $\text{asp}_{55}\text{SCSF}/\text{N}\nabla 2\text{CV150}$  及び  $\text{asp}_{55}\text{SCSF}/\text{N}\nabla 2\text{CV158}$  から成る群から選択された配列によりコードされたホモダイマーである、請求項6に記載の組成物。

8. 前記蛋白質が、ポリマーと反応性の遊離スルヒドリル基と共にシステイン残基を含有する1個のサブユニットから

成る組換ヘテロダイマーである、請求項1に記載の組成物。

9. 前記蛋白質がミューテイン CSF-1 である、請求項1に記載の組成物。

10. 前記蛋白質が真核性宿主中で発現されそこから分泌されたヒト CSF-1 である、請求項1に記載の組成物。

11. 前記蛋白質が、LCSF/C $\nabla$ 150; tyr<sub>5</sub>, LCSF/C $\nabla$ 150; LCSF/C $\nabla$ 190; tyr<sub>5</sub>, LCSF/C $\nabla$ 190; LCSF/C $\nabla$ 191; tyr<sub>5</sub>, LCSF/C $\nabla$ 191; LCSF/C $\nabla$ 221; tyr<sub>5</sub>, LCSF/C $\nabla$ 221; LCSF/C $\nabla$ 223; tyr<sub>5</sub>, LCSF/C $\nabla$ 223; LCSF/C $\nabla$ 236; tyr<sub>5</sub>, LCSF/C $\nabla$ 236; LCSF/C $\nabla$ 238; tyr<sub>5</sub>, LCSF/C $\nabla$ 238; LCSF/C $\nabla$ 249; tyr<sub>5</sub>, LCSF/C $\nabla$ 249; LCSF/C $\nabla$ 258; tyr<sub>5</sub>, LCSF/C $\nabla$ 258; LCSF/C $\nabla$ 411; tyr<sub>5</sub>, LCSF/C $\nabla$ 411; LCSF/C $\nabla$ 464; tyr<sub>5</sub>, LCSF/C $\nabla$ 464; SCSF/C $\nabla$ 150; SCSF/C $\nabla$ 153; SCSF/C $\nabla$ 158; 対応する asp<sub>5</sub>, SCSF; 並びにそれらの gln<sub>52</sub> ミューテインから成る群から選択された配列によりコードされたダイマーである、請求項10に記載の組成物。

12. 前記ポリマーが約1000~100,000 ダルトンの平均分子量を有するものである、請求項1に記載の組成物。

13. 前記ポリマーが4000~40,000ダルトンの平均分子量を有するものである、請求項1に記載の組成物。

14. 前記ポリマーが該ポリマーのカルボン酸の活性エステルによる反応を介して蛋白質に接合している、請求項1に記載の組成物。

15. 前記ポリマーが非置換ポリエチレングリコールホモポリマー、モノメチルポリエチレングリコールホモポリマー又

はポリオキシエチル化グリセロールである、請求項14に記載の組成物。

16. 前記蛋白質がその1~3個の遊離アミノ基を介して接合しており、そして前記ポリマーが該蛋白質の該遊離アミノ基と反応するN-ヒドロキシサクシンイミドエステル、p-ニトロフェニルエステル又は4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゼンスルホン酸エステル基を含有している、請求項1に記載の組成物。

17. 接合する前記アミノ基がリジン残基もしくはN-末端アミノ酸又はその組合せに存在する、請求項16に記載の組成物。

18. 前記蛋白質が1又は複数のシステイン残基を介して接合しており、そして前記ポリマーが該システイン残基の遊離スルヒドリル基と反応するマレイミド基又はハロアセチル基を含有する、請求項1に記載の組成物。

19. 前記蛋白質がグリコシル化されており、そして該蛋白質上の炭水化物成分の少なくとも1つを介してポリマーに接合しており、そして該ポリマーが、該炭水化物成分の酸化により形成される遊離アルデヒドと反応するアミノ、ヒドラジン又はヒドラジド基を含有する、請求項1に記載の組成物。

20. 前記蛋白質が真核性宿主において組換え発現される組換え CSF-1 のダイマー生成物である、請求項19に記載の組成物。

21. 前記真核宿主が哺乳類、昆虫、酵母又は真菌の細胞である、請求項20に記載の組成物。

22. 医薬として許容される水性キャリア媒体に溶解している請求項1の組成物を含んで成る医薬製剤。

23. 前記蛋白質が再生されておりそしてインビトロで精製されており、そして細菌において組換え発現される組換 CSF-1 クローンの生成物である、請求項22に記載の製剤。

24. 前記蛋白質が、1.0 ng/mg CSF-1 未清のエンドトキシン含量を有しそして実質的にバイロジエンを含有しない生物学的に活性な再生された CSF-1 ダイマーである、請求項23に記載の製剤。

25. 前記蛋白質がウレクソン結合を介して前記ポリマーに結合している、請求項1に記載の組成物。

26. 前記ポリマーが該ポリマーのカルボン酸の活性エステルとの反応を介して蛋白質に接合している、請求項1に記載の組成物。

27. 前記ポリマーが非置換ポリエチレングリコールホモポリマー、モノメチルポリエチレングリコールホモポリマー又はポリオキシエチル化グリセロールである、請求項25に記載の組成物。

28. 1モルの CSF-1 ダイマー当り1~3モルのポリマーが存在する、請求項26に記載の組成物。

29. 前記共有結合により接合した蛋白質が CSF-1 モル当りポリマーのモル数に関して実質的に純粋である、請求項1に記載の組成物。

30. 前記実質的に純粋な接合した蛋白質が硫酸アンモニウム分画により得られたものである、請求項29に記載の組成物。

31. インビトロコロニー刺激因子-1(CSF-1)測定において一次マクロファージコロニーの形成を刺激する、接合した蛋白質の製造方法であって、

(a) 少なくとも1個の末端反応基を有する水溶性ポリマーを用意し、該ポリマーは、ポリエチレン又はポリプロピレングリコールホモポリマー及びポリオキシエチル化ポリオール並びにポリビニルアルコールから成る群から選択されたものであり、該ホモポリマーはアルキル基により一端において置換されているか又は置換されておらず;

(b) 蛋白質を前記ポリマーの反応性基と反応せしめることにより該蛋白質を生物学的に活性にしそして選択に接合せしめ;そして

(c) 接合した蛋白質を精製する;ことを含んで成る方法。

32. 前記ポリマーが約1,000~100,000 ダルトンの平均分子量を有する、請求項31に記載の方法。

33. 前記蛋白質がその1~3個の遊離アミノ基を介して接合しており、そして前記ポリマーが該蛋白質の遊離アミノ基と反応するN-ヒドロキシサクシンイミドエステル、p-ニトロフェニルエステル、又は4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゼンスルホン酸エステル基を含有する、請求項31に記載の方法。

34. 前記アミノ基がリジン残基もしくはN-末端アミノ酸又はその組合せであり、そして段階(b)が約7~9のpHにおいて行われる、請求項33に記載の方法。

35. 前記ポリマーが非置換ポリエチレングリコールホモポリマー、モノメチルポリエチレングリコールホモポリマー又はポリオキシエチル化グリセロールである、請求項31に記載の方法。

36. 前記蛋白質が組換えヒト CSF-1 である、請求項31に記載の方法。

37. 前記蛋白質が細菌中で組換え発現されたものであり、そして LCSP/CV150 ないし CV464; Tyr<sub>3</sub>, LCSP/CV150 ないし CV464; SCSP/CV150 ないし CV166; Asp<sub>3</sub>, SCSP/CV150 ないし CV166; 並びにこれらの Glu<sub>2</sub> ミューテイン及び N<sub>2</sub>3 及び N<sub>2</sub>3 ミューテインから成る群から選択された予想アミノ酸配列を有するホモダイマーであり、ここで LCSP は第2図のアミノ酸 1-522 として示される配列によりコードされており、そして SCSP は第1図のアミノ酸 1-224 として示される配列によりコードされている、請求項31に記載の方法。

38. 前記蛋白質が真核性宿主中で発現されそこから分泌されたヒト CSF-1 である、請求項31に記載の方法。

39. 段階(c)の後、医薬として許容される水性キャリアー媒体中に蛋白質に製剤化する段階をさらに含んで成る、請求項31に記載の方法。

40. 前記蛋白質がグリコシル化されており、そして該蛋白質上の炭水化物成分の少なくとも1つを介してポリマーに接合しており、そして該ポリマーが、該炭水化物成分の酸化により形成される遊離アルデヒドと反応するアミノ、ヒドラジン又はヒドラジド基を含有する、請求項1に記載の組成物。

#### 特許(内容に変更なし)

#### 明 細 書

#### ポリマーとコロニー刺激因子との接合体

本発明は生物学的に活性なコロニー刺激因子-1 (CSF-1) の化学修飾に関し、この化学修飾はこの蛋白質の化学的及び/又は生理学的性質を変更するものである。さらに詳しくは、本発明はポリマーへの CSF-1 の選択的接合による哺乳類での該蛋白質の循環半減期の増加に関する。

コロニー刺激因子-1 (CSF-1) (M-CSF としても知られている) は、半固体培地中にプレートされた骨髓細胞によるコロニーの形成を刺激することができる幾つかの蛋白質の内の1つである。CSF-1 は、主としてマクロファージコロニーの形成を刺激するその能力により他のコロニー刺激因子から区別される。他の CSF は、好中顆粒球とマクロファージ、もっぱら好中顆粒球、又は好中顆粒球及び好酸顆粒球並びにマクロファージ、から成るコロニーの生産を刺激する。これらの CSF の総説は Dexter, I.M. *Nature* (1984) 309: 746, 及び Vadas, M.A. *J. Immunol.* (1983) 130: 793 により発表されている。現在、CSF-1 活性に特異的であることが知られている日常的インビボ測定は存在しない。

CSF-1 は天然源から精製されている [例えば、Csejtesy, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1986) 138: 238; 及び部分的アミノ酸決定を可能にする天然 CSF-1 のイムノアフィニティークロマトグラフィーに関する1986年8月14日に公開

された PCT 公開 No. WO 86/04587 を参照のこと)。CSF-1 はまた、2つの見かけ上関連している cDNA クローン、すなわち (1) 32個のアミノ酸のシグナル配列により先行される 224個のアミノ酸のモノマー蛋白質をコードする「短い」形 (Kawasakiら、*Science* (1985) 230: 292-296); 及び (2) やはり32個のアミノ酸のシグナル配列により先行される 522個のアミノ酸のモノマー蛋白質をコードする「長い」形を用いて組換え DNA から製造されている。この長い形は、1988年6月29日に公開されたヨーロッパ特許出願公開 No. 0272779 及び Ladner ら *EMBO J.* (1987) 6: 2693 (それぞれ引用により本明細書に組み入れる); 並びに Hong ら *Science* (1987) 235: 1504-1509 及び 1987年11月9日に公開された PCT WO 87/06954 に開示されているように、2つのグループによりクローニングされそして発現されている。(これらの2つのクロンの DNA 及びアミノ酸配列はそれぞれ第1図及び第2図に示される。) CSF-1 の長い形及び短い形の両者は Clark 及び Kamen, *Science* (1987) 236: 1229-1237 により記載されている。32個のアミノ酸のシグナル配列により先行される 406個のアミノ酸のモノマー蛋白質をコードする「中間」形も最近報告されている (Corretti ら (1988) *Mol. Immunol.* 25: 761-770)。

42. 前記真核宿主が哺乳類、昆虫、酵母又は真菌の細胞である、請求項41に記載の方法。

43. 段階(c)が硫酸アンモニウム分画を含んで成る、請求項31に記載の方法。

44. 請求項22の製剤の免疫療法的有効量を哺乳類に投与することを含んで成る、哺乳類における感染性疾患の予防的又は治療的処置方法。

45. 請求項22の製剤の免疫療法的有効量を哺乳類に投与することを含んで成る哺乳類における腫瘍の治療方法。

された PCT 公開 No. WO 86/04587 を参照のこと)。CSF-1 はまた、2つの見かけ上関連している cDNA クローン、すなわち (1) 32個のアミノ酸のシグナル配列により先行される 224個のアミノ酸のモノマー蛋白質をコードする「短い」形 (Kawasakiら、*Science* (1985) 230: 292-296); 及び (2) やはり32個のアミノ酸のシグナル配列により先行される 522個のアミノ酸のモノマー蛋白質をコードする「長い」形を用いて組換え DNA から製造されている。この長い形は、1988年6月29日に公開されたヨーロッパ特許出願公開 No. 0272779 及び Ladner ら *EMBO J.* (1987) 6: 2693 (それぞれ引用により本明細書に組み入れる); 並びに Hong ら *Science* (1987) 235: 1504-1509 及び 1987年11月9日に公開された PCT WO 87/06954 に開示されているように、2つのグループによりクローニングされそして発現されている。(これらの2つのクロンの DNA 及びアミノ酸配列はそれぞれ第1図及び第2図に示される。) CSF-1 の長い形及び短い形の両者は Clark 及び Kamen, *Science* (1987) 236: 1229-1237 により記載されている。32個のアミノ酸のシグナル配列により先行される 406個のアミノ酸のモノマー蛋白質をコードする「中間」形も最近報告されている (Corretti ら (1988) *Mol. Immunol.* 25: 761-770)。

CSF-1 の長い形及び短い形をコードする DNA は、ゲノム性 CSF-1 コード DNA のエクソン6の上流部分の変動的スプライシング連結から生ずるらしい。CSF-1 がある種の真核細胞において長い又は短い cDNA 形から発現される場合、

このものはダイマー糖蛋白質として分泌され、そしてC-末端において多様にプロセシングされ、そして/又は多様にグリコシル化されるようである。従って、還元されたモノマー形がウエスタン分析にかけられる時、種々の分子量のCSF-1蛋白質が見出される。

長い形及び短い形のアミノ酸配列は、単離されたクローンのDNA配列から及びそれらとゲノム配列との関連性により予想されるように、シグナルペプチドの閉鎖の後のN-末端における最初の149アミノ酸において同一であり、そしてその後、アミノ酸150をコードするコドンの前の追加の894bp断片(298個の追加のアミノ酸をコードする)の長いクローンにおける挿入の結果として異なる。従って、遺伝子の短い形及び長い形の両者は、C-末端及びN-末端において同一の配列の領域をコードする。成熟短形の最初の145又は147個のアミノ酸(1988年3月30日に公開されたヨーロッパ特許出願公開No.0261592: Cerrettiら、前掲)、又は成熟長形の最少の190又は221アミノ酸、のみをコードする短縮されたcDNAが真核細胞中で発現される場合、生物学的に活性な蛋白質が回収されている。

1) 生来のN-末端及び成熟蛋白質のアミノ酸150におけるC-末端、並びに2) N-末端の最初のアミノ酸を除去するための短縮及び成熟蛋白質のアミノ酸150におけるC-末端、を含む蛋白質をコードするように、最初Kawasakiら、*Science* (1985) 230: 291により記載された短クローンcDNAを変更することにより、組換えCSF-1が大腸菌で発現された。

もしくは脱水生成物への接合による核ヘモグロビン分子の酸素運搬能力の増加を記載している。米国特許No.4,609,546はペプチド又は糖蛋白質例えばコロニー刺激因子とポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーとの接合が生理的活性の持続を増加させ得ることを記載している。この態様において試験された蛋白質は、易水溶性の酵素類及び生来のインターフェロンのみである。1986年7月17日に公開されたPCT No. 86/04145は、Fc受容体への結合を減少せしめるための抗体のPEG修飾を記載している。米国特許No.4,179,937は、所望の生理活性を実質的に維持しながらポリペプチドの免疫原性を低下せしめるために、酵素及びインシュリンのごとき水溶性ポリペプチドとPEG又はPPGとの接合を記載している。1985年9月11日に公開された武田薬品工業のEP 154,316は、リンホカインの少なくとも1個の一般アミノ基に直接結合したPEGを含有するIL-2のごとき化学的に修飾されたリンホカインを開示し、そしてクレームしている。さらにKaireら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* (1987) 84: 1487はPEGによるIL-2の修飾を記載している。

他の多くの参考文献が、蛋白質、例えば $\alpha$ -1-ブロティナーゼインヒビター、アスパラギナーゼ、ウリカーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ、ストレプトキナーゼ、プラスミノーゲン活性化因子、IgG、アルブミン、リボプロテインリパーゼ、西洋ワサビパーオキシダーゼ、カタラーゼ、アルギノーゼ及びアスパラギナーゼ、並びにペプチドのPEG誘導体化の概念を開示している。リジンを介してのこれら

これらの蛋白質は精製されそしてホモダイマーを形成するように再生(refold)され、そしてサイズ排除高速液体クロマトグラフィーにおいてそれぞれ約43,000及び40,000の見かけ分子量を有することが見出された。発現された蛋白質のC-末端がアミノ酸150又は158でありそしてN-末端の3個までのアミノ酸が除去されるように変形されたCSF-1蛋白質も調製されている。

小蛋白質(約70kd未満)はしばしば、静脈内注射の後血中で比較的短い半減期を有する。薬物の循環からの急速なクリアランスはしばしばその効力を低下せしめる。所望の療法効果を維持しながらより少量のポリペプチド又はより低頻度の注射が投与されるように循環ペプチドの半減期を延長することがしばしば望ましい。その生体内半減期を変更し、その免疫原性を低下せしめ、又はそれが生体内に導入された場合に生ずるかもしれない蛋白質の凝集減少もしくは除去するであろうCSF-1蛋白質の修飾が望ましいであろう。この様な修飾には、実質的に直鎖のポリマー、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール(PPG)、デキストラン又はポリビニルアルコールによる修飾が含まれる。

例えば、米国特許No.4,261,973は、免疫原性アレルギー分子と非免疫原性水溶性ポリマー、例えばPEG又はポリビニルアルコールによる核アレルギーの免疫原性を減少することを記載している。米国特許No.4,301,144は、ヘモグロビンのPEG、PPG、エチレングリコールとプロピレングリコールとのコポリマー、又はこのようなポリマーのエーテル、エステル

の誘導体化は、半減期を改善し、免疫原性を低下せしめ、溶解度を上昇せしめ、そして一般に効力を増強する(これは少い頻度の投与を可能にする)ものとして報告されている。ほとんどの場合、生体内での改善された成能を達成するために蛋白質は分子当り複数の修飾を必要とし、そして生体外活性はこの様な修飾により有意に低下した。

ポリペプチドのシステイン残基を介してのPEGによるIL-2、IFN- $\beta$ 及びイムノトキシンの修飾が1987年1月15日に公開されたPCT No. 87/00056に記載されている。

これらの特許又は特許公開に加えて、幾つかの論文が酵素、IgG及びアルブミンのごとき蛋白質のための修飾剤としての活性化されたPEG又はPPGの使用の概念を記載している。例えば、Inadaら、*Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 122: 845-850 (1984)は、PEGと接合するためにシアヌル酸塩化物を使用することにより水溶性リボプロテインリパーゼを修飾してそれをベンゼンのごとき有機溶剤に可溶性にすることを記載している。Tokahashiら、*Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 121: 261-265 (1984)は、シアヌル酸塩化トリアジンを用いてPEGにより西洋ワサビパーオキシダーゼを修飾して、該水溶性酵素をベンゼン中で活性で且つ可溶性にすることを記載している。

蛋白質接合反応においてポリビニルアルコール(PVA)の使用を開示している特許及び特許公開には、ベンジルペニシリンとPVAとの接合に関する米国特許No.4,296,097及びNo. 4,430,260;  $\alpha$ -1-ブロティナーゼインヒビターとヘパリ

ン、PVA又はPEGのごときポリマーとの接合に関する米国特許No.4,496,689 (EP 147,761); ヘモグロビンとキャリアーとしてのPVAとの非共有結合を開示している1985年5月22日に公開されたEP 142,125; 蛋白質にカップリングした架橋されていない水不溶性PVAに関するDE 2312615 (Explorations AB 1BF); 並びにPVAとヒトヘモグロビンAとの接合に関する1985年5月23日に公開されたDE 3,340,592が含まれる。

蛋白質とPVAとの接合体に関する論文には Sabetら、Indian J. Chem., Sec. A (1984) 23A (5) (PVAと蛋白質との相互作用を開示する)、Weiら、Immunol. (1984) 51 (4): 687-696 (PVAに接合したトリメチルを開示する)、Leeら、J. Immunol. (1981) 126: 414-418及びHubbardら、J. Immunol. (1981) 126: 407-413 (いずれもPVAに接合したDNPを開示する)、LeeらInt. Arch. Allergy Appl. Immunol. (1980) 63: 1-13 (PVAに接合したアンチベンジルベニシロイル IgEを開示する)、Sehon、Prog. Allergy (1982) 32: 161-202 (PVAを介して接合したアレルゲン及びハプテンを開示する)、Holford-Strevensら、Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. (1982) 67: 109-116 (PVAと抗原/ハプテンとの接合を開示する)、並びにSehon及びLee、Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. (1981) 66 (Sepp. 1), 39-42頁 (PVAに接合したハプテン/アレルゲンを開示する) が含まれる。

PCT公開No. WO 86/04607 及びWO 87/03204 並びにRalphら、Immunobiol. (1986) 172: 194は、抗-感染剤、抗

-腫瘍剤又は創傷治癒剤としての使用を含む、CSF-1の種々の潜在的用途を開示している。

しかしながら、これらの文献はいずれも、その循環半減期又は効力を増加しながらその生物活性を保持するようにポリマー、例えばPEG又はポリビニルアルコールによりCSF-1をいかに修飾するかについての詳細は開示していない。さらに、幾つかの蛋白質は特に接合を介しての相互作用に一層感受性であるから、望ましい反応条件の種類又は蛋白質修飾の程度を推定することは一般的に不可能である。

従って本発明は、有用な生物活性を保持しながら生体内半減期を延長するためにコロニー刺激因子を修飾することを提供する。この修飾されたCSF-1は、未修飾CSF-1に比べて減少したそして/又は低頻度の投与において生体内で細胞を刺激するために使用することができる。

第二の利点として、この修飾はCSF-1の免疫原性を低下せしめることができ(特に異種において使用される場合、例えばヒトのCSF-1をウシに使用する場合)そして/又は起こるかもしれない蛋白質の凝集を減少せしめることができる。

さらに具体的には、本発明は、生物学的に活性な組成物に関し、この組成物は哺乳類において延長された生体内半減期を有し、インビトロコロニー刺激因子-1測定において一次マクロファージコロニーの形成を刺激する蛋白質を含んで成り、この蛋白質はポリエチレングリコール又はポリプロピレングリコールホモポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール及びポリビニルアルコールから成る群から選択された水溶性

ポリマーに共有結合により接合しており、ここで該ホモポリマーはその一端においてアルキル基により置換されているか又は置換されていない。CSF-1蛋白質は、(1) リジン残基及びN-末端アミノ酸を含めての遊離アミノ基(好ましくは1~3部位)、(2) 真核細胞で発現されたグリコシル化されたCSF-1の炭水化物成分(1又は複数)、又はCSF-1に人為的に作られた遊離スルヒドリル基、を介してポリマーに接合させることができる。

好ましくは、ポリマーは非置換ポリエチレングリコール(PEG)、モノメチルPEG(mPEG)、又はポリオキシエチル化グリセロール(POG)であり、これらは(1) PEG、mPEG又はPOGカルボン酸又は炭酸の活性エステル(好ましくはN-ヒドロキシサクシニミドエステル又はパラニトロフェニルエステル)から形成されるアミド又はウレタン結合を介してCSF-1のリジン残基に連結され;(2) アミン、ヒドラジン又はヒドラジド結合を介してCSF-1の炭水化物成分に連結され;あるいは(3) マレイミド基又はハロアセチル基(ここでハロゲンは、Br、Cl又はIである)を介してCSF-1のシステイン残基に連結される。

本発明の他の観点は前記の接合した蛋白質の製造方法に関し、この方法は、

(a) 少なくとも1個の末端反応基を有する水溶性ポリマーを用意し、該ポリマーはポリエチレン又はポリプロピレングリコールホモポリマー及びポリオキシエチル化ポリオール並びにポリビニルアルコールから成る群から選択されたもの

であり、該ホモポリマーはアルキル基により一端において置換されているか又は置換されておらず;

(b) 蛋白質を前記ポリマーの反応性基と反応せしめることにより該蛋白質を生物学的に活性にしそして選択に接合せしめ;そして

(c) 接合した蛋白質を精製することを含んで成る。

他の観点において、本発明は、医薬として許容される水性キャリアー媒体に溶解した接合したCSF-1蛋白質を含んで成る医薬製品の有効量を哺乳類に投与することを含んで成る、哺乳類における感染性疾患もしくは癌の予防的又は治療的処置のための方法、及び哺乳類における癌治療、創傷治療、骨粗鬆症治療、コレステロール低下又は抗体依存性細胞毒性(ADCC)のために効果的な方法に関する。

第1図は、pCSF-17のcDNA及び推定されるアミノ酸配列(34アミノ酸リーダー配列及びアミノ酸1~224)を示す。

第2図は、CSF-4のcDNA及び推定されるアミノ酸配列(部分的アミノ酸リーダー配列及びアミノ酸1~522)を示す。

第3A図は、誘導体化されていないCSF-1(rCSF-1)(SCSF/H $\nabla$ 2C $\nabla$ 150)のサイズ排除HPLCクロマトグラムを示す。第3B図は、平均分子量7000のPEG-NHSにより誘導体化された同じrCSF-1のHPLCクロマトグラムを示す。

第4図は、平均分子量11,000のPEG-NHSにより誘導体化されたrCSF-1(SCSF/C $\nabla$ 150)のサイズ排除HPLCクロマトグラムを示す。

第6図は、E. コリrCSF-1(SCSF/CV150)、第2図中の配列を有するrCSF-1に由来する二量体生成物(リーダー配列及びC-末端配列を欠くが、しかしE. コリ構成物中に存在する末端メチオニンの本質上すべてを保持している)、グリコシル化された522-アミノ酸前駆体(LCSF)から生ずる哺乳類細胞(COS)中で発現されたrCSF-1、及びPEG-11,000で誘導体化されたE. コリrCSF-1(SCSF/CV150)について、ラット血漿中CSF-1濃度対時間のグラフを示す。

第6図は、PEG-11,000で誘導体化されたrCSF-1(SCSF/CV150)の静脈内注射の後120分でのラット血漿のサイズ排除HPLCクロマトグラムを示す。ラジオイムノアッセイ(RIA)及び280nmにおける吸光度がプロットされている。

第7図は、E. コリrCSF-1(SCSF/NV3CV158)及び11,000 PGEにより誘導体化された同じ蛋白質について、ラット血漿中CSF-1濃度対時間のグラフを示す。

第8図は、PEG-11,000で誘導体化されたrCSF-1(SCSF/CV150)のSDS-PAGE分析を示す。クマシーブルーにより蛋白質について染色されたゲル(10%)は、ジスルフィド結合の還元を伴う又は伴わない、第5図において使用したサンプルについてである。

#### 定義

「コロニー刺激因子-1」というのは、Metcalf, J. Cell Physiol. (1970年)、76: 89の標準的な生体外コロニー刺激アッセイ(このアッセイにおいてはポリペプチドが一次的にマクロファージコロニーの形成を刺激する)においてCSF-

1に対する生物活性をもつ2量体(ダイマー)タンパク質又は糖タンパク質化合物のことである。「生物活性CSF-1」は、同じCSF-1の非接合形態のものと基本的に同じ比活性をマウスの骨髓コロニー形成アッセイにおいて有するか或いはその比活性の約10%以上を有する接合体CSF-1の化合物を意味する。「天然の(生来の)」CSF-1は、非組換え型CSF-1である。マウスのCSF-1は、欧州特許公開第027 2779号、Rajavashisth他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987年) 84: 1157及びDeLamarter他著のNucleic Acids Res. (1987年) 15: 2389内に記述されている。

「臨床的に純粋な」CSF-1というのは、RP-HPLCによるか又は還元的又は非還元的なSDS-PAGE分析により少なくとも95%のCSF-1を含み、約1.0 ng/mg CSF-1未満の内毒素(エンドトキシン)を有する細菌内で組換えにより生成される生物活性をもつヒトCSF-1の調製剤を意味する。

「選択的に接合された」というのは、タンパク質の遊離アミノ基(好ましくは、最大の生物活性を保持するため1つ又は2つの遊離アミノ基)を介して、又は遊離スルフィドリル基(もしあれば)を介して、或いはタンパク質中に存在する炭水化物部分(もしあれば)を介して共有結合されたタンパク質のことである。

「有効量」及び「免疫療法上の有効量」は、腫瘍の溶解を促進するため或いは又感染性疾患を予防又は治療するためといった特定の機能を行なうのに有効な量を意味する。

「療法的処置」は、「予防的処置」が疾病の罹患を予防す

るための処置を表わすのに対して、疾病に罹患した後に処置することを表わす。

「哺乳動物」というのは、あらゆる哺乳類種を表わし、ウサギ、マウス、イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、霊長類及びヒトを含み、好ましくはヒトのことである。

「ミューテイン」というのは、サイト特異性突然変異誘発といった技法を用いて変性させられた核酸配列から発現された遺伝子操作により作られたタンパク質である。かかる遺伝的変性は、親タンパク質のアミノ酸配列に対する1又は複数の置換、付加及び/又は欠失を結果として引き起こすように設計されている。

「医薬として許容される」というのは、有効成分の生物活性の有効性と干渉せず、安定性があり、しかもそれが投与される宿主にとって有毒でないような担体媒体に関する。

「ホモダイマー」とは、それが、組換え型タンパク質の生成又はプロセッシングに際して場合によって生じるわずかな微変異性をもつ2量体タンパク質をも含むが、その2つのサブユニットについて基本的に同一である2量体タンパク質のことである。

「ヘテロダイマー」というのは、アミノ酸配列、アミノ酸の数又はその両方において異なっているサブユニットをもつ2量体タンパク質である。換言すると、ヘテロダイマーは2つの同一でないサブユニットを有している。

#### CSF-1-タンパク質

背景の節で記載したとおり、CSF-1はその2量体形態で

生物活性を有する。ここで用いられるCSF-1は「天然の」2量体であっても組換えにより生成された2量体であってもよい。天然の2量体CSF-1種は、ヒトの尿、培養された単核細胞及びいくつかの細胞系の培養上澄み液から得られたものである。さまざまなアミノ酸配列及び長さから成るCSF-1単量体をコード化する組換え型DNAを得ることが可能であった。第1図及び第2図は、両者共にそのN末端に32-アミノ酸シグナル配列を含んでいる、それぞれ最大長、プロセッシングされていない短形及び長形態に対するDNA配列及びそのDNA配列から予測されたアミノ酸配列を示している。単量体CSF-1タンパク質の配列はここでは便宜上、リーダー配列無しの224-アミノ酸短形態配列(ここではSCSFと呼ぶ)及びリーダー配列無しの522-アミノ酸長形態配列(ここではLCSFと呼ぶ)であるものとみなされている。点突然変異、挿入、欠失及び/又は転座(トランスロケーション)によって変更されたDNA配列から生成されたその他のCSF-1二量体も同様に、それらが生物活性を有する場合に本発明の化学的変更から恩恵を受けるものと期待されている。

真核生物であれ原核生物であれあらゆる宿主の中で生成される組換え型CSF-1は、選択されたアミノ酸側基好ましくは遊離アミノ基を介して重合体へと接合されうる。好ましくは、CSF-1をコードするDNAは細菌内で発現され、結果として得られるCSF-1は、純化及び再生の後のホモダイマーである。接合が炭水化物部分を介したものである場合、宿主は真核生物であってよく、或いは又、生体外でグリコシル

化が行なわれる可能性もある。

便宜上、記述されているさまざまなcDNA構成概念によりコード化されるタンパク質サブユニットの一次構造は、ここでは以下のような短縮記号を用いて呼ぶことにする。すなわち、LCSFは、完全なシグナル配列無しで第2図に示されている上述の欧州特許公開第0272779号に記載の、クローンCSF-4について開示された522-アミノ酸配列を表わす。SCSFは、本書に同様に参考文献として内含されている上述のカワサキ論文(Science(1985年)230:292-296)内に記述され、シグナル配列無し、第1図に示されている、クローンpCSF-17について開示された224-アミノ酸配列を表わす。

1つの特定のpCSF-17クローン誘導体が、位置59においてアスパラギン酸残基を有していることがわかるだろう。開示されているLCSFクローンは同様に、位置59においてAspをコード化する。第1図及び第2図に示されている配列内のアミノ酸置換に相応するミューテインは、位置と共に指定されている置換によってそれ相応して呼称される。CSF-1のミューテイン形態は、1988年6月29日に公開された欧州特許公開第0272779号内に開示されており、かかる開示は本書中に参考文献として内含される。これらのタンパク質をコードする構成物が細菌内で発現される場合、最終生成物は、さまざまなレベルでN末端メチオニンを保持することも可能である。N末端メチオニンの除去の程度は高い信頼性で予測できないことから、この可能性は表記中には含み入れられていない。これらの基本的SCSF及びLCSF配列のC末端及びN末端の切

形は、それぞれC $\nabla$ 又はN $\nabla$ と呼ばれる。C末端の欠失の後には、残っている天然(未変性)構造のアミノ酸の数を表わす数字が続く；すなわち、N末端欠失については、N $\nabla$ の後にはN末端から欠失されたアミノ酸の数が続くことになる。従って例えば、LCSF/C $\nabla$ 150は、長いCSF配列の最初の150のアミノ酸残基を含むタンパク質をコードする構成物を表わす。又SCSF/C $\nabla$ 158は、短形態の最初の158のアミノ酸残基を含むタンパク質をコード化する構成物を表わしている。さらに、SCSF/N $\nabla$ 2は、2つのN末端アミノ酸が欠失せられた状態での短形態をコードする構成物を表わしている。

(前述のとおり、LCSF及びSCSFは、位置150から始まって発散し、LCSFクローン内の298のアミノ酸の後に再収束する)。LCSF/N $\nabla$ 2C $\nabla$ 150は、2つのN末端グルタミン酸残基が欠失せられているという点を除いて、LCSF/C $\nabla$ 150と同じものである1形態を表わしている。

さまざまなCSF-1形態をコードするプラスミドが現在使用可能であり、細菌系内で発現されうる。CSF-1の長形態をコードするプラスミドの一形態は、真核生物細胞内で発現される可能性があり、この場合、真核細胞はクローンを「プロセシングし」、C末端で切断されたタンパク質を分泌し、N末端からリーダー配列が除去されている。代替的には、クローンを切断して、真核細胞又は原核細胞内で特異的なC末端欠失された形態を発現することも可能である。さらに、大腸菌(E.Coli)内で発現された結果として得たタンパク質がより相同であるように、最初の2つ又は3つのN末端コドン

欠失させることも可能である。限定的に言う、大腸菌構成物内の成熟した天然配列N末端のすぐ上流でコードされたN末端メチオニン(これは、翻訳後プロセシングにより除去されていないかぎり、タンパク質内に「N末端Met」として保持されている)は、これらのN末端欠失構成物からより容易に除去される。さらに、逆相HPLC(RP-HPLC)を用いて検出できる有意な不均一性は、「天然の」N末端配列をコードする遺伝子(例えば、短形態のもの、ミューテインSCSF/C $\nabla$ 150)が大腸菌内で発現され、精製された生成物が特徴づけられる場合に、見い出される。この不均一性は、2つのN末端コドンが欠けた相応するCSF-1遺伝子(グルタミン酸)が発現される場合に、無くなる。従って、その他の短い及び長いCSF-1遺伝子構成物のN末端切除形も同様に用いることができる。

好ましい構成は、タンパク質が基本的に、LCSF/C $\nabla$ 150からC $\nabla$ 464、 $\text{tyr}_{15}$ LCSF/C $\nabla$ 150からC $\nabla$ 464； $\text{asp}_{15}$ SCSF/C $\nabla$ 150からC $\nabla$ 166から成るグループの中から選ばれた1つのアミノ酸配列で構成されているようなものである。さらに好ましいのは、基本的に、LCSF/C $\nabla$ 150；LCSF/C $\nabla$ 190；LCSF/C $\nabla$ 221；LCSF/C $\nabla$ 223；LCSF/C $\nabla$ 236；LCSF/C $\nabla$ 238；LCSF/C $\nabla$ 249；LCSF/C $\nabla$ 258；LCSF/C $\nabla$ 406；LCSF/C $\nabla$ 411；LCSF/C $\nabla$ 464； $\text{asp}_{15}$ SCSF/C $\nabla$ 150； $\text{asp}_{15}$ SCSF/C $\nabla$ 153；及び $\text{asp}_{15}$ SCSF/C $\nabla$ 158から成るグループの中から選択された1つのアミノ酸配列で構成されたCSF-1タンパク質である。

本書において変更のためのCSF-1タンパク質を結果としてもたらす特に好ましい構成には、LCSF/C $\nabla$ 190、LCSF/C $\nabla$ 221、 $\text{asp}_{15}$ SCSF/C $\nabla$ 158、 $\text{asp}_{15}$ SCSF/C $\nabla$ 150及びこれらに相応するN $\nabla$ 2及びN $\nabla$ 3形態をコード化するクローンが含まれている。

最も好ましい出発物質は、 $\text{asp}_{15}$ SCSF/C $\nabla$ 150； $\text{asp}_{15}$ SCSF/C $\nabla$ 158；LCSF/C $\nabla$ 221及びその相応するN $\nabla$ 3形態をコードするクローンの生成物である。

あるいは、CSF-1は、特にCSF-1ヘテロダイマーの反応性システイン残基を避けて接合が行なわれる場合、CSF-1のさまざまな単量体ユニットの中から調製されたヘテロダイマーの形をしていてもよい。プロセシングの差異又はクローン構成上の差異によるC末端配列の変化によって形成された数多くのCSF-1タンパク質は、ヘテロダイマー形成に用いることのできるさまざまな出発物質を提供する。従って、再生により新奇のヘテロダイマーを形成することができる。例えば、SCSF/C $\nabla$ 150の単量体形態は、LCSF/C $\nabla$ 157の単量体形態と共に、本書中に参考文献として内含されている1988年10月20日に公示されたPCT公報W0 88/08003号の方法に従って、混合及び処理されうる。次に、ヘテロダイマーを、さまざまなクロマトグラフィ及びその他の方法によりホモダイマー及びオリゴマー副生成物から分離することができる。ヘテロダイマー(特にSCSF/C $\nabla$ 150及びLCSF/C $\nabla$ 157)は、157位置において1つのサブユニット上で終結させることができ、こうして、複合重合体との反応のための潜在的に

遊離したスルフィドリル基を提供する。本発明の方法を受けた同様の混合物は、アミノ酸置換を有する成分のヘテロダイマー（例えば  $\text{glu}_{15}\text{LCSP/C}\nabla 221$  及び  $\text{LCSP/C}\nabla 190$ ）に導く可能性がある。

異なる単量体は、生体外で混合させてもよいし、又同じ細菌内で生成させることもできる。同一細菌内で生成される場合には、各々の単量体の発現のための構成物が、同じ宿主内へ導入される。かかる実施態様においては、各々の構成物が異なる菌株（例えば、テトラサイクリン耐性 ( $\text{Tc}^R$ ) 及びアンピシリン耐性 ( $\text{Amp}^R$ )）を持ち、そのため同時形質転換された宿主が選択されるようにすることが好ましい。次に、同時形質転換された細胞は増殖させられ、2つの形態の混合物を得るべく誘導される。

さらに、分子が生物活性を保持することを条件として、PEG反応のためシステイン残基上に遊離スルフィドリル基を含む  $\text{rCSF-1}$  の構成物を生成するため、自然でない場所での単一のシステイン残基を  $\text{CSF-1}$  に誘導することもできる。2つサブユニットのうちの片方の中にのみ一定の与えられたシステインの置換を含むヘテロダイマー構成物も又同様に遊離スルフィドリルの生成に役立ちうる。同様に、炭水化物部分を、真核系からの発現によって又は酵母での生体外グリコシル化によって  $\text{CSF-1}$  タンパク質上に置くこともできる。

組換え型  $\text{CSF-1}$  タンパク質は、宿主によるプロセッシングのため、クローンにより規定された正確な長さを保持している場合もあれば保持していない場合もある。従って、出発物

質であるタンパク質は同じ呼称で呼ばれるが、実際にはこれらの呼称はクローンの構成物を表わしており、本書中に開示されている方法のための出発物質の実際の長さは、C末端アミノ酸の数により規定されるものよりも長い場合も短い場合もある（それがN末端Metを有する場合）ということを理解しておかなくてはならない。

上述のように、 $\text{CSF-1}$  は、例えば哺乳動物、昆虫又は酵母菌の細胞といった真核性細胞の中で生成できる。哺乳動物の細胞内での生産については、PCT特許公開  $\text{W0 86/04607}$  号に記述されている。 $\text{CSF-1}$  は、本書中にその開示が参考文献として包含されているLuckow他著の *Bio/technology* (1988年) 6: 47中に記述されているように、バキュロウイルスベクターを用いて、昆虫の細胞から生成することができる。このタイプの  $\text{CSF-1}$  生産のその他の記述は、Heaver他著の *Bio/technology* (1988年) 6: 287内に含まれている。昆虫の細胞で生産された  $\text{CSF-1}$  ( $\text{SCSF/C}\nabla 150$ ) は、非常に短い生体内半減期を有することがわかったグリコシル化された2量体である。 $\text{SCSF}$  のアミノ酸配列内の2つのN-連鎖グリコシル化シグナル ( $\text{Asn122}$  及び  $\text{Asn140}$ ) は、グリコシル化された生物活性ある昆虫細胞で生産された  $\text{CSF-1}$  タンパク質 ( $\text{Gln122}$ ,  $\text{Gln140}$ ) を生成すべく、サイト指向性の突然変異誘発を用いてDNA内で変更されうる。この後、このタンパク質を、その生体内半減期を増大するため原核生物にて発現された  $\text{rCSF-1}$  について行なわれたように1つの重合体とそのリジン又はシステイン残基を介して反応させることができる。

例えばPEG-アミン、PEG-ヒドラジン又はPEG-ヒドラジドを、糖のビシナルジオールをアルデヒドに変換すべく過ヨウ素酸塩で酸化された  $\text{CSF-1}$  タンパク質と反応させることにより、炭水化物上のグリコシル化された  $\text{CSF-1}$  に対し重合体を共有結合させることができる。PEG-アミンは、PEG-OHをまずPEG-トシル化物にそして次にPEG-フタルイミドに変換することによって調製でき、フタルイミドはヒドラジンで開裂されて、Gabriel合成でPEG-NH<sub>2</sub>を生成する。PEG-ヒドラジン及びPEG-ヒドラジンは当業者にとっては周知の方法で調製することができる。PEG誘導体は、ビシナルジオールがアルデヒドに変換された炭水化物サイトでカップリングする。

$\text{CSF-1}$  が細菌宿主内で細胞内生産される場合には、PCT公開  $\text{W0 88/08003}$  以前に記されているように、高い収量で活性二量体を形成すべく、再生されなくてはならない。要するに、この手順においては、成熟タンパク質又は融合タンパク質のいずれとして分泌又は生産されたかに関わらず可溶化された単量体は、還元的条件の下でカオトロピック環境内に保たれる。かかる保持には、 $\beta$ -メルカプトエタノール又はジチオスレイトール(DIT) といった適当な還元剤の使用が関与している。可溶化されたタンパク質は、標準的に、約2~100mMのチオール化合物が存在する中で約7~8.6のpHで8Mの尿素又は7Mの塩酸グアニジウムといったものの中に維持される。この可溶化された形態から出発して、単量体を直接再生することもできるし、或いは又吸収性ゲル上のクロマ

トグラフィ、イオン交換カラムを用いたクロマトグラフィ又はゲル透過クロマトグラフィといった適当な純化手順により再生の前に残りのタンパク質から純化させることもできる。ゲル透過クロマトグラフィは、異なる分子量の不純物から一般に予め分かっている望ましい単量体長さの容易なサイズ分離を可能にするため、有用である。尿素中のDEABセフォロズクロマトグラフィは、濃縮すると同時に精製し、差別以上に容易にスケールアップできることから、さらに有用である。S-S結合した集合体の形成を防ぐため、還元的条件下で精製を行なうことが好ましい。

従って、使用されるクロマトグラフィ手順の如何に関わらず、クロマトグラフィ用カラム又はパッチに装入するのに用いられる溶液及び溶離用溶液中には、適当な還元剤が含まれられる。いくつかの例においては、基本的に低いpHがジスルフィド結合の形成を防ぎいくつかのクロマトグラフィシステムと適合性があることから、還元剤の代わりに低いpHを用いてもよい。さらに、低濃度のキレート剤の含有は、タンパク質の還元された形態を保持する助けとなりうる。

次に部分的に精製された単量体は、二量体の形成のため再生条件に付される。この段階中のタンパク質濃度は、きわめて重要である。一般に、 $\text{CSF-1}$  再生反応の体積に対する最終百分率収量は、タンパク質濃度が  $\text{CSF-1}$  タンパク質1mgあたり約2mg未満になると増大する。0.03~1.0mg/mlという濃度範囲が好ましい。再生条件には、適当な時間（通常数時間）にわたるカオトロピック環境の漸進的な除去、或いは又



タンパク質及びカオトロブ剤の望ましい濃度に至るまでの試料の希釈が含まれるであろう。同様に可能であるのは、カオトロブがゆっくりと除去されていく間の透析又は中空ファイバダイアフィルトレーションといった、一定のタンパク質濃度を与える方法である。このプロセスの終りに、カオトロブが濃減された時点で、比較的非変性のレベルが達成される。例えば、塩酸グアニジンがカオトロブとして用いられた場合、約2 M未満好ましくは0.1~1 Mの最終濃度が達成され、尿素がカオトロブとして用いられた場合には、約1 M未満好ましくは0.1~0.5 Mの最終濃度が達成される。

CSF-1の場合ジスルフィド結合の形成（そのうちの単数又は複数は2つの鎖を結合する）を必要とするような生物活性ある2量体構成を打ち立てるジスルフィドに対するスルフィド基の酸化を可能にするように、再生が行なわれる。単数又は複数の鎖内ジスルフィドも形成される。この2量体形成を促進する適当なレドックス（酸化還元）条件には、酸化された及び還元されたグルタチオンといったスルフィドリル/ジスルフィド試薬の組合せが含まれる。還元グルタチオン対酸化グルタチオン又はその他のスルフィドリル/ジスルフィドの組合せの比率は標準的に約2 mM/0.1 mMから0.5 mM/1.0 mMである。その他の酸化方法も同様に許容できる。いずれにせよ、再生プロセス中の溶液のpHは、反応に有利に作用するよう約7.5から9.0に保たなくてはならない。初期精製を行なったきわめて還元性の条件は、再生プロセス中にはもはや用いられない、ということは明白である。再生プ

ロセス中塩化ナトリウムといった塩の重大な濃縮を排除することにより、次に続く濃縮/精製段階としてイオン交換クロマトグラフィを用いることが可能となる。

再生プロセス中、CSF-1のより高いオリゴ種が形成される可能性がある。この凝集（集合）プロセスは、温度制御を通して最低限におさえられ、ここでは、約0~4℃という低い温度が25~37℃というより高い温度よりも好ましい。

再生されたCSF-1調製物の中に存在する残留レドックス剤は、次に続く精製段階中ジスルフィド交換を容易にする可能性がある。望ましくないこのようなジスルフィド交換を阻止するさらに2つの好ましい方法には、pHを7.0以下に低下させること又はレドックス試薬を除去するためのダイアフィルトレーションがある。

例えば、再生された二量体CSF-1をさらに精製する前に、例えばDEAEセファロースを用いたイオン交換クロマトグラフィへの再生された物質の直接装入により、レドックス物質の除去及び再生されたタンパク質の濃縮を行なうことができる。往々にしてこのような手順は8前後のpHにて行なわれる。しかしながらpHを5.5から7.0の範囲まで低下させることにより、オリゴマー形成は減少し、2量体CSF-1の収量は増大した。

再生、濃縮及び精製の後、2量体はさらに残留レドックス物質及びその他のタンパク質から、単量体について前述したものと類似の手順を用いて精製される。適切な手段の中には、特に、ゲル透過、疎水性相互作用クロマトグラフィ、イオン

交換クロマトグラフィ及び逆相HPLCなどが含まれる。

発熱物質又はその他のエンドトキシン（内毒素）といった望ましくない不純物の除去のための特に有効なプロトコルには、フェニル-TSK又はフェニル-セファロースカラム上のクロマトグラフィの使用がある。クロマトグラフィは、基本的にエンドトキシンの無い試薬及び条件を用いて行なわれる。望まれる2量体CSF-1は、中性pHにて約1.5 Mの硫酸アンモニウムの中で可溶性でありかつ安定しており、約4℃から約10℃好ましくは約4℃といった低い温度にてこれらの条件下でカラム上に装入される。硫酸アンモニウムを付加した時点で形成する沈殿物を除去すると、再生されたCSF-1の不安定な形態及びいくつかの集合体が除去される。CSF-1タンパク質は、中性緩衝液内でエチレングリコールが増大する（0%から50%）状態で低減する硫酸アンモニウム（1.5 Mから0 M）の勾配を用いて溶離させることができる。CSF-1は、約0.6 Mの硫酸アンモニウムで、フェニル-TSKカラムから35%のエチレングリコールを溶離する。エチレングリコールの代りにプロピレングリコールを用いることができるが、この場合溶離条件は幾分か異なる。代替的な支持体も同様に用いることができ、実態フェニル-セファロースは、精製CSF-1 2量体タンパク質のより大規模な生産のために好まれる。

#### 組合

上述のCSF-1タンパク質は、（1）1又は複数の遊離アミノ基、好ましくは生物活性の損失を最低限におさえるため

わずかに1つ又は2つの基、（2）タンパク質上の少なくとも1つの炭水化物成分、又は（3）クローンに誘導され再生の後遊離状態にとどまっている1又は複数の遊離スルフィド基のいずれかを介して、重合体に接合される。

タンパク質に接合された重合体分子の数は、例えば酸の劣化又は消化及びそれに続くアミノ酸分析（結合がマレイミド又はブロモアセチルシステインの結合であり、誘導体化が高い（4モル/モル以上）の場合）を含むさまざまな方法によって決定することができる。代替的には、接合したタンパク質は、酵素（例えばトリプシン）で小さなフラグメントに消化され、カラムクロマトグラフィで分離されうる。修飾前後のタンパク質のペプチド地図を比較し、溶離時間を異にするフラグメントを配列決定して重合体の付着場所を決定する。第3の変形態様においては、重合体をカップリングに先立って放射性標識付けし、CSF-1タンパク質1モルにつき何モルの放射性重合体が付着されるかを決定することができる。比較的均等な分子量の重合体が均等な分子量のCSF-1に対して接合される場合には、接合体の分子量の測定が、CSF-1 1分子あたりの重合体数の見積りとして役立つ。

接合させるべき残基は、以下のようなものであり得る：

- （1）何らかの遊離アミノ基（リジン残基におけるε-アミノ基、又は場合によってはN末端における遊離アミン基）、
- （2）CSF-1に導入又は構成されているシステイン残基上の遊離スルフィド基、又は（3）炭水化物成分（他の箇所で論述）。タンパク質は、PEGにより遊離アミノ基上で

過度に誘導体化されている場合（すなわち約1乃至3の修飾アミノ酸残基を含んでいる場合）、誘導体化されていないCSF-1の生物活性の25%から100%を保持しているということがわかっている。しかしながら、それがPEGで高度に誘導体化されている場合、接合タンパク質は、CSF-1のタイプ、PEG重合体の長さ及び使用されたリンカー及び反応条件に応じて、著しく低い可測生物活性を有する。

タンパク質が付着される重合体は、あらゆる場合において室温で水溶性をもつことをその条件として、ポリエチレングリコール(PEG)のホモポリマー又はポリプロピレングリコール(PPG)のホモポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール又はポリビニル・アルコールである。ポリオキシエチル化されたポリオールには、ポリオキシエチル化グリセロール、ポリオキシエチル化ソルビトール、ポリオキシエチル化グルコースなどがある。

ポリオキシエチル化グリセロールのグリセロールバックボーンは、例えばモノ、ジ、及びトリグリセリドの形で動物及びヒトなどの体内に天然に発生するものと同じバックボーンである。従ってかかる化合物は、人体内で必ずしも異質のものとはみられない可能性がある。

重合体の平均分子量は好ましくは、例えば使用される特定のCSF-1の分子量に応じて約1000から100000ダルトンの間、好ましくは約4000から40000ダルトンの間である。変更の目的は、生物活性が保持され未複合タンパク質に比べ生体内半減期が高められ、しかも免疫原性が減少した複合タンパク質

を得ることにあるため、重合体の分子量は、これらの条件を最適化するように選択されることになる（例えば、約80kd以上の見かけの分子量の変更2量体CSF-1タンパク質）。

天然の2量体CSF-1（すなわち組換え型でないタンパク質）を誘導体化することによって得られるもう1つの利点は、精製のむずかしい希少なCSF-1の使用がかかる変更により最大限になるということである。

好ましくは、PEGホモポリマーはアルキル基で一端にて置換されるが、これは未置換状態のままでもよい。好ましくはアルキル基はC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル基であり、最も好ましくはメチル基である。最も好ましくは、重合体はモノメチル置換されたPEGホモポリマーであり、その分子量は約4000乃至40000ダルトンである。

共有結合修飾反応は、上述の方法のいずれによっても、好ましくは約pH5-9でさらに好ましくは7-9で（タンパク質上の反応基が遊離アミノ基である場合）で行なわれてよい。後者のアプローチを用いると、タンパク質は、重合体に付加された少なくとも1つの末端反応基を介して接合される。この反応基（単数又は複数）を伴う重合体をここでは「活性化重合体」と呼ぶ。反応基は、タンパク質の遊離アミノ又はその他の反応基と選択的に反応する。（複数の反応基がある場合、架橋を防ぐため複合条件を入念に制御しなくてはならない。しかしながら、1価の種が好まれる）。

使用される無傷の活性化重合体の量は、一般に、タンパク質に対する活性重合体のモル過剰分の約1倍から30倍である。

使用される正確なモル比は、使用される活性化重合体のタイプ、pH、タンパク質濃度及び使用されるCSF-1分子を含む数多くの変数によって左右される。PEG-クロロ酢酸塩の活性エステル以外の活性化重合体については、タンパク質に対する活性化重合体のモル過剰分は、好ましくはアミノ基の誘導体化のためのCSF-1 2量体1モルあたり約11モル未満であり、さらに好ましくはCSF-1 1モルあたり約1モルから8モルである。タンパク質に対するPEG-クロロ酢酸塩の活性エステル(PEG-PNP)のモル過剰分は、好ましくは、アミノ基の誘導体化のためのCSF-1 2量体1モルあたり約5モル未満であり、さらに好ましくはCSF-1 1モルあたり約1モルから2モルである。

一般に、この方法には、活性化重合体を調製することならびにその後活性化重合体とタンパク質を反応させることが関与している。標準的には、反応は約7-9のpHの緩衝液内、往々にして、内部エステルを含まないPEG-NHS試薬が用いられる場合には約10mMのHepes (pH7.5)、100mMのNaClで、或いは又、PEG-PNP試薬が用いられる場合には約50mMのホウ酸ナトリウム (pH9)で行なわれる。これら両方について以下に記述する。反応は一般に約20分から約12時間0℃から25℃で、好ましくは20℃で25分から35分又は4℃で3時間、行なわれる。複合の後、望ましい生成物が回収され、カラムクロマトグラフィなどによって純化される。

活性PEGを用いた修飾反応は、単数又は複数の段階を用いて、以下に記す数多くの方法で実行できる。一段階反応で

活性化PEGを生産するのに用いることのできる適当な修飾剤の例としては、塩化シアヌール酸（2, 4, 6-トリクロロ-S-トリアジン）及びフッ化シアヌール酸がある。

1つの好ましい実施態様においては、変更反応は2段階で行なわれ、ここにおいてPEG-OHはまず第一に無水コハク酸又は無水グルタル酸といった無水酸と反応させられてカルボキシル酸を形成し、次にカルボキシル酸はこれと反応できる1つの化合物と反応させられて、タンパク質と反応しうる反応性エステル基と共に活性化されたPEGを形成する。かかる化合物の例としては、N-ヒドロキシスクシニミド、スルフォーN-ヒドロキシスクシニミド、4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゼンスルホン酸などが挙げられる。好ましくは、N-ヒドロキシスクシニミドが用いられる。

例えば、モノメチル置換PEGを高温例えば約100℃から110℃で4時間、無水グルタル酸と反応させることができる。こうして生産されたモノメチルPEG-グルタル酸は、次にジシクロヘキシル又はジイソプロピルカルボジイミドといったカルボジイミド試薬の存在する中でN-ヒドロキシスクシニミドと反応させられ、活性化重合体、メトキシポリエチレングリコール-N-スクシニミジルグルタル酸塩を生成し、これは次に純化後のタンパク質と反応させることができる。この方法については、Abuchowski他、*Cancer Biochem. Biophys.* 7: 175-186 (1984年)内に詳述されている。


もう1つの例においては、モノメチル置換PEGを無水グルタル酸と反応させ、その後ジシクロヘキシルカルボジイミ

ドの存在する中で4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゼンスルホン酸(HNSA)と反応させて、活性化重合体を生成することができる。HNSAについては、Bhatnagar他著 Peptides: Synthesis, Structure-Function, Proceedings of Seventh American Peptide Symposium (ペプチド: その合成-構造-機能、第7回米国ペプチドシンポジウム議事録)、Rich他(eds.)(Pierce Chemical Co. Rockford IL, 1981年)、p97-100、Nitecki他著 High Technology Route to Virus Vaccines (ウイルスワクチンへのハイテクの道)(American Society for Microbiology; 1985年)、p43-46 (1984年11月8日-10日の座談会に基づく)、表題「Novel Agent for Coupling Synthetic Peptides to Carriers and Its Application (担体に対する合成ペプチドの新しいカップリング剤とその応用)」、ならびにAldwin他著、Anal. Biochem. (1987年) 164: 494-501 の中で記述されている。これら全ての開示は、本書中に参考文献として内含されている。

エステル結合はアミド結合に比べて化学的及び生理学的により反応性が高いため、最終生成物の中でエステルを生成しない活性化ポリエチレングリコール分子とタンパク質を誘導体化することが好ましい可能性がある。

1実施態様においては、PEGは、出発物質としてPEG-アミン又はPEG-OHを用いてタンパク質に対する付着のために活性化される。PEG-OHは、本書中にその開示が参考文献として内含されているV.N.R. Pillan他 J. Organic Chem. 45: 5364-5370 (1980年) により記述されているように、


はナフエニル基の中から選ばれた芳香族基及びこれらの置換基を1~4個選択的に含むビリジル基である。これらのエステルは、化合物Iについてはアルファーハロアルカン酸又はそのエステルでのポリエチレングリコールのアルキル化とそれに続くHO-CH<sub>2</sub>-CN 又はLGに相当する基でのエステル化によって、或いは又化合物(II)についてはその酸へのPEGの酸化とそれに続くHO-CH<sub>2</sub>-CN 又はLGに相当する基でのエステル化によって生成される。最も好ましくは、化学式Iが調製され、活性化剤は、パラニトロフェノール又はオルトニトロフェノールである。最も好ましくは、重合体のパラニトロフェニルエステルから形成されたアミド結合を介して、重合体をタンパク質に接合させる。例えば、PEG-OHをPEG-O-に変換させBrCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>と反応させたり、メチルエステルを加水分解させたり、酸をジシクロヘキシルカルボジイミドの存在する中でp-ニトロフェノールと反応さ

せてPEG-O-CH<sub>2</sub>COO--NO<sub>2</sub>を生成することができる。

この重合体の方は、精製の後、CSF-1の利用可能な遊離アミノ基と反応させられる。

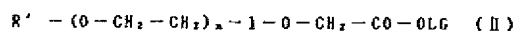
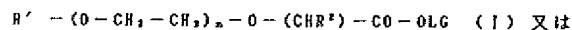
もう1つの実施態様においては、PEG-OHはクロル燐酸塩(クロロカーボネートとも呼ばれる)と反応させられ(PEG-PNP)とも呼ばれるPEG活性エステルを形成する。PEG活性エステルが形成されると、これをCSF-1と反応させてPEG/CSF-1接合体を形成する。その全体が本書中に参考文献

PEG-アミンに変換される。簡単に言うと、mPEG-OHをmPEG-トリシル化物にその後mPEGフタルイミドに変換することによりモノメチルPEG-アミン(mPEG)が調製され、フタルイミドはヒドラジンで分割されて、Gabriel合成でmPEG-NH<sub>2</sub>を生成する。次にmPEG-アミンは室温にて約4時間無水グルタル酸と反応させられ、mPEG-NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COOHを生成する。反応後、生成物を沈殿させ、純化させ、N-ヒドロキシスクシニミド及びジシクロヘキシルカルボジイミドと反応さ

せて、mPEGNHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COO-Nを生成する。この

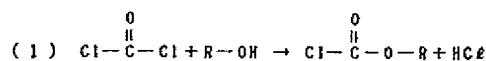
化合物を次に、CSF-1ポリペプチドの適当な遊離アミノ基と反応させることができる。

もう1つの実施態様において、かかる接合に有用なポリエチレングリコールカルボキシル酸の活性エステル形態は、Nitecki他、Peptide Chemistry 1987年、Shiba & Sakakibara (Ed), Protein Research Foundation(タンパク質研究基金)、大阪(1988年)の中で記述されている。簡単に言うと、活性エステルは以下のような化学式を有している:



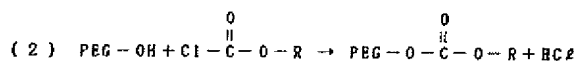
なお式中、R'は1~4個の炭素原子の低級アルキル基であり、R\*はH又は一有機置換基であり、nは約8~500、LGは、シアノメチルの中から選ばれた脱落基、芳香族基をより不安定にする1~5個の置換基と置換されたフェニル又

として内含されているVeronese他 1985年, Biochem. and Biotech. 11: 141-152 も同様に参照されたい。クロル燐酸塩は、Aldrichといった会社から購入できる。これを以下に等式(1)に示されているように作ることも可能である。



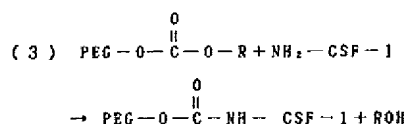
クロル燐酸塩は、塩化カルボニルとしても知られているホスゲンで、-OHを有する炭素上に電子求引性置換体を含むアルコール(R-OH)と反応させることによって作られる。アルコールは好ましくは酸性アルコール、さらに好ましくは高い消衰係数をもつ芳香族環を含む酸性アルコールである。R基の例は、以下のようなものである: N-ヒドロキシスクシニミド、N-ヒドロキシスルホスクシニミド、シアノメチルエステル、ベンゼン、ナフタレン上の全てのニトロ、クロロ及びシアノ置換、又はビリジン、パラニトロフェノール(PNP)、オルトニトロフェノール(ONP)などの、ヘテロ原子を含んでいても含まなくてもよいさらに大きい芳香環系などである。最も好ましいR基はPNP及びONPである。

クロル燐酸塩が形成されると、これはPEG-OHと反応させられて等式(2)に示されているようにPEG活性エステルを形成する。



クロル燐酸塩は、2つのサイトすなわち塩素とカルボニル基の間の結合(比較的反応性が高い)及びカルボニルとO-

R基の間の結合(比較的反応性が低い)において反応性を有する。さらに反応性の高いサイトは、クロル燐酸塩がPEGに結合するところである。PEG-OH及びクロル燐酸塩は好ましくは、CHCl<sub>3</sub>、又はCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>といった適当な溶剤中で室温にて同時に付加される。好ましくは、0時間から1時間後までの間にアシル化触媒が加えられる。好ましくはこの触媒はピリジン又はジメチルピリジンである。好ましくはクロル燐酸塩は、最高12Mの過剰分さらに好ましくは2Mの過剰分になるまで付加される。この混合物を好ましくは4時間さらに好ましくは16時間混合させる。この時点で、沈殿物が形成する可能性がある。この沈殿物は、ろ過により除去されるか又は廃棄される。ホワットマングラスファイバフィルタ(GH/B)といったろ過装置が受容可能である。結果として得られる溶液にはPEG活性エステルならびに未反応のPEG及び過剰のクロル燐酸塩が含まれている。これはエーテルを付加することにより沈殿させられる。好ましくはエーテルはジエチルエーテルである。沈殿物は、PEG活性エステルを含み、エーテルといった適当な溶剤を用いて洗浄され、必要とあらば再度溶解又は再度沈殿させることができる。PEG活性エステルが形成されると、等式(3)に示されているようにCSF-1とこれを複合させる:



(Amer. Soc. for Microbiol., 1985年) p43~46、(前述)により記述されている4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゼンスルホン酸のN-マレイミド-6-アミノカブロン酸エステル(mal-sac-HNSA)と反応させられる。かかる反応は好ましくは、PEG-NH<sub>2</sub>に対し約5倍のmal-sac HNSAのモル過剰分で、行なわれる。加水分解された又は未反応のmal-sac HNSAの除去(例えば、透析、ダイアフィルトレーション又はサイズ排除クロマトグラフィによる)の後、次に、等モル量の試薬及びタンパク質を用いて緩衝液内で室温でタンパク質と試薬を反応させることができる。N-スクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサノ-1-カルボキシル酸塩(SHCC)又はHCH<sub>2</sub>CO-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-HNSAエステル(なお式中XはBr, Cl又はIである)といったその他の試薬も、当業者にとっては周知のさまざまな反応条件の下で mal-sac HNSAと同じ機能を果たすことができる。

#### 接合体の精製

接合反応の後、反応条件に応じて異なるアイデンティティを有する種の混合物が存在する可能性がある。CSF-1に対し接合されたPEG部分の数において異なるこれらの種は、クロマトグラフィ、電気泳動及び塩分別を含むさまざまな方法により分離される。フェニルセファロースを用いた疎水性相互作用クロマトグラフィ(HIC)が特に有用であることが示された。非還元性 SDS-PAGE又は分子ふるいクロマトグラフィを用いてサイズ分離を達成することもできる。さらにCSF-1接合体ならびにインターロイキン-2(IL-2)とい

PEG活性エステルのクロル燐酸塩部分はおおむね、利用可能な反応性の比較的低いサイトを有している。このサイトでは、PEGとCSF-1の間の共有結合が形成される。最終生成物の中では、PEG部分はカルバミン酸塩とも呼ばれるウレタ

ンによりCSF-1に結合され、結合は $-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-$ 構造をもつ。この結合は比較的安定しており、生理学的条件の下ではほとんど又は全く加水分解なくPEGをCSF-1に複合された状態に保つことになる。

大腸菌からのホモダイマー組換え型CSF-1は、再生が適切に完了された後は、多数の反応性遊離スルフヒドリル基を含んでいない。しかしながら、クローンを遺伝子的に変更して、再生の後もスルフヒドリル基を保持しうる単数又は複数の新奇のシステイン残基を含み入れることも可能である。このように生成されたCSF-1突然変異タンパク質はなお、ここにおいて有用であるべく有意な生物活性を保持していなくてはならない。

あるいは、cys<sub>133</sub>上といったいくつかのSH基が活性化重合体による変更に使用可能となるようにホモダイマーを部分的に再生するか又は選択されたヘテロダイマーを作り出すことによって、遊離スルフヒドリルを生成することができる。

システイン残基を介してタンパク質が複合される場合、好ましい接合様式は以下のとおりである:すなわち、上述のようなmPEG-NH<sub>2</sub>は、好ましくは0.5時間から1.5時間室温で、Nitecki他、High-Technology Route to Virus Vaccines

ったその他のタンパク質の接合体の塩析も有用であることが立証された。一般に用いられる塩は硫酸アンモニウム、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 硫酸ナトリウム、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; マグネシウム塩及びリン酸塩である。複合度の高い種は、接合度の低いタンパク質及び未接合タンパク質に比べて低い塩濃度で沈殿した。部分的に精製された種のこれらの技術のうちのいずれかを通しての再循環は、結果として、タンパク質1分子あたりの重合体数に関しほぼ相同の接合タンパク質種をもたらす可能性がある。

#### 製剤

このように変更され選択的に接合程度に関し精製されたタンパク質は、次に、好ましくは約3から8さらに好ましくは5から8のpHで、非毒性の安定した薬学的に受諾可能な水性担体媒質に製剤される。投与は、従来のプロトコル及び養生法によるが、好ましくは静脈内投与を含む全身系のものである。診断目的といった生体外応用については、投与様式や製剤形態は重要ではない。一般には、培養基又はかん流媒質と相容性のある水性製剤形態が用いられる。治療のため生体内で用いられる場合、かかる化合物は当該技術分野において既知のとおり、注入用の水、緩衝液及び安定剤といった従来の生理学的に受諾可能な賦形剤を含んでいてもよい。マンニトールといった水溶性の担体もオプションとして媒質に付加することができる。

修飾CSF-1は、単独の有効成分としてでも又補助的活性をもつその他のタンパク質又は化合物と組合わせた形でも

使用可能である。かかるその他の化合物としては、IL-1、-2、-3、-4 インターフェロン（アルファ、ベータ又はガンマ）といったリンフォカインのアドリアマイシン、GM-CSF；G-CSF及び腫瘍壊死因子などの抗腫瘍剤が含まれる。変異CSF-1の効果は、このような付加的な成分の存在により改良される。タンパク質を含む薬学的化合物についての製剤技術の要約は、例えば、Remingtonの薬学（Remington's Pharmaceutical Science），Mack Publishing Co.，Easton, PA，最新版に記されている。

製剤内のタンパク質の用量レベルは、臨床前試験の後に得られた生体内効力データにより左右され、臨床応用に応じて変化する。タンパク質が中に溶解される媒質は、混合物が再組成された時点で薬学的に受諾可能なpHにある。

製剤が凍結乾燥される場合、凍結乾燥された混合物は、バイアル（小びん）の中に例えば注射用精製水といった従来の非経口水性溶剤を注入することによって再組成される。

前述のように調製された再組成された製剤は、治療上有効な量（すなわち、死亡率又は受諾不可能な罹病率なく患者の病理状態を削除又は軽減する量）でヒト又はその他の哺乳動物に対し経口外投与し治療を与えるのに適している。CSF-1療法は、免疫系の強化、マクロファージの細胞毒性作用の強化、単核細胞及び果粒細胞白血球数の増加、サイトメガロウイルスや細菌感染（例えばグラム陰性セプシス）といった感染性疾患の、哺乳動物に対する治療的又は予防的投与による処置、哺乳動物におけるサルコーマ（肉腫）又はメラノーマ

マ（黒色腫）といった腫瘍の苦しみの治療、コレステロール血症（Nimer他、（1988年）JAMA 260：3297-3300によりGM-CSFについて記述されているようなもの）の治療、及び／又は、哺乳動物における創傷の治癒といったさまざまな適応症に対して適切でありうる。さらに、CSF-1は、本書中にその開示が参考資料として内含されている、1988年7月6日に公示された欧州特許公報第0273778号の中に記述されているように、免疫系の刺激のためG-CSFと組合わせることができる。

接合CSF-1の用量及び投与量は、例えば、薬物速度論、疾病又は状態の内容、重合体のタイプ及び長さ、特定のCSF-1の特性例えばその治療指数、活性スペクトル、患者及び患者の既往症などにより左右される。さまざまな変異CSF-1タンパク質は、異なる投与経路にとって有利な異なる薬物速度論上及び治療上の特性を有していると予想される。長く作用する薬物は、3～4日に一度、一週間に一度又は2週間に一度投与するだけでよい。浄化率は、例えば重合体のタイプ、付着される重合体のサイズ、及び重合体が付着されるアミノ酸配列を変えることによって患者の特定のニーズに合わせるべく最大限の柔軟性を与えるよう変化させることができる。

本発明をさらに詳しく示す以下の例においては、全ての割合及び百分率は相反する指示のないかぎり重量での割合であり、全ての温度は摂氏温度である。

### 例 1.

結合方法1による、PEG化されたCSF1の調製

#### A. 活性化されたPEG-NHSの調製

まず第1にUnion Carbide社から入手可能なモノメチルPEG-7000を100℃から110℃で4時間無水グルタル酸と反応させることによってか殿いは又本書にその開示が参考文献として内含されているAbuchowski他（Cancer Biochem. Biophys. 7：175-186（1984年））の方法に類似した方法によって、平均分子量7000のモノメチルPEGの線形エステルを得ることができる。結果として得られたPEGグルタル酸塩を、Abuchowski他（前述）がp176で詳述しているように、ジシクロヘキシルカルボジイミドが存在する中で、N-ヒドロキシスクシニミドと反応させた。その結果得られた生成物は、メトキシポリエチレングリコールN-スクシニミジルグルタル酸塩であり、以下これをPEG<sup>\*</sup>-7000と呼ぶ。PEG-4800（Union Carbide社から入手可能）を同じ方法で反応させた結果、PEG<sup>\*</sup>-4800が得られた。

PEG-11,000グルタルアミドNHS種（PEG<sup>\*</sup>-11000）は、Pillai他、J. Org. Chem. 45：5364-5370（1980年）の手順に従って以下のように調製された：すなわち、Union Carbide社から入手した平均分子量11000ダルトンの線形モノメチルPEG（1.5mmole）をまず10mlの塩化メチレン内で溶解させ、次に1.8ml（22.2mmole）のピリジン及び6.0g（31.6mmole）のp-トルエン-スルフォニル塩化物を加えた。フラスコは窒素でフラッシングし、反応混合物は一晩室温で攪拌した。混

合物を約5mlまで濃縮し、生成物を75mlのエチルエーテルで沈殿させた。沈殿物を収集しエーテルで洗浄した。生成物（mPEGトシル化物）は、エタノールから再結晶された。

20mlのジメチルホルムアミドの中にmPEGトシル化物（約1.5mmole）を溶解し、2.5g（17.0mmole）のカリウムフタルイミドを加えた。4時間、窒素下の還流で溶液を加熱した。形成した沈殿物をろ過してとり除き、ろ液を300mlのエーテルに滴下して生成物を沈殿させた。沈殿物をろ過してエーテルで洗浄した。30mlの塩化メチレンの中で生成物を懸濁させ、0.5時間攪拌した。不溶性の不純物をろ過してとり除き、生成物（mPEG-フタルイミド）をエーテルで沈殿させた。次に、15mlのエタノール内にmPEG-フタルイミド（約1.1mmole）を溶解させ、2.0ml（41.2mmole）のヒドラジン水和物を加えた。混合物を一晩還流させた。反応混合物を室温で冷却し、生成物をエステルで沈殿させた。

沈殿物はろ過により収集し、25mlの塩化メチレン内で再度懸濁させた。不溶性の不純物をろ過して取り除き、エーテルで沈殿させた。この沈殿物、mPEG-11000アミンをCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>内で懸濁させ、ろ過し、エーテルでさらに2回沈殿させた。2回目に、この沈殿物は塩化メチレン中に完全に溶解できた。

10mlのジオクサン中に合計0.5gのmPEG-11000アミンを溶解させ、これに0.25gの無水グルタル酸を加えた。室温で4時間反応させた。反応後、生成物mPEG-NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOHを約100mlのエーテルで沈殿させた。混合物をろ過し、生成物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>内に溶解させ、エーテル内にろ過し、ろ過、乾

爆させた。生成物の収量は 200mg であった。

次に  $\text{mPEG-NHCO(CH}_2)_3\text{COOH}$  を、PEG\* 7000 のため前述したようにジシクロヘキシルカルボジイミドの存在する中で N-ヒドロキシスクシニミドと反応させた。結果として得られた生成物は、ここでは PEG\* -11000 と呼ばれる。

#### B. CSF-1 の精製と再生

SCSP/N $\nabla$ 3C $\nabla$ 158 遺伝子を含むプラスミド pJN653 (かかるプラスミドは 1987 年 11 月 12 日付で ATCC 第 67561 号として供託されている) で形質転換された大腸菌株 HW22 を、6.5 g/l のグルコース、2.2 mM の  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、95  $\mu\text{M}$  の  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、及び 26 mg/l のチアミン  $\cdot \text{HCl}$  の無菌付加を伴い、10 という OD<sub>550 nm</sub> に達するまで 30℃ で、96 mM の  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、28 mM の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、4 mM のクエン酸  $\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1.7 ml/l の TK9 (30 mM の  $\text{ZnSO}_4$ 、30 mM の  $\text{MgSO}_4$ 、1 mM の  $\text{CuSO}_4$ ) を含む基本培地の中で 10 リットル入り発酵槽内で成長させた。次にカザミノ酸を 2% w/v まで付加した。培養温度を 37℃ にまで上昇させることにより、CSF-1 表現を誘発した。4 時間後、680 nm での吸収率は 79 に達した。

細胞を 5 倍の濃度で収穫し、Dorr-Oliver 接線交差流微孔性ろ過を用いて pH 8.5 で 5 mM の EDTA 10 体積に対し分別ろ過した。細胞を Manton-Gaulin の高圧機械式細胞ホモジナイザーの中に 7500 psi で 3 回通過させることにより分析した。0.1% (v/v) まで 1-オクタノールを付加し、ホモゲネートを 4℃ で一晩保持した。

このホモゲネートを、63% (w/v) のスクロース (シロ糖)

溶液を付加することによって 25% のスクロースにした。9000  $\times g$ 、1 リットル/分及び 4~6℃ での連続流ディスクスタック遠心分離 (Westphalia SB7) により細胞デブリから不溶性タンパク質分画 (屈折力ある物質) を分離した。湿潤な沈殿物を 50:50 (w/v) で脱イオン水と混合し、-20℃ でアリコート内に保存した。

屈折力ある物質の懸濁液 25 グラム (約 390 mg のタンパク質) を、25 mM の Tris、10 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.4)、1 mM のエチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) 及び 4 mM のジチオスレイトール (DTT) を含む 8 M の尿素 250 ml 中で可溶化した。室温で 2 時間置いた後、15 分間 15000  $\times g$  での遠心分離により溶液を清澄させた。次に、25 mM の Tris、10 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を含む 6 M の尿素内で平衡化された 5  $\times$  8 m の DEAE-セファロース (Pharmacia) カラム上に、可溶化した CSF-1 の 150 ml のアリコートを装入了。カラムは 1 mM の DTT と 1 mM の EDTA を含むよう変更された上述の溶液 1 ベッド容積 (bed volume) で洗浄し、次に、洗浄緩衝液内で 0~0.6 M の塩化ナトリウムの 1.4 リットルの塩勾配で CSF-1 を溶離させた。CSF-1 は、約 0.06 M の塩化ナトリウムでピーク溶離を示した。次に残りの 90 ml の可溶化された屈折力ある物質を、同様のやり方で DEAE-セファロースカラム全体にわたり純化させた。組合わせた CSF-1 ブール (165 ml) は、約 50% の純度で約 250 mg のタンパク質を含んでいた。

次に、4℃ に予め冷却された 50 mM の Tris (pH 8.5)、5 mM の EDTA、2 mM の還元グルタチオン、1 mM の酸化グルタチオンを

含む再生用緩衝液の中へ DEAE-ブールを希釈させることによって、CSF-1 を再生した。4℃ で 30 時間 CSF-1 を再生させた。再生された CSF-1 の pH を次に、8.5% のリン酸溶液を用いて 6.8 に調整した。その後、15000  $\times g$  で 10 分間遠心分離により溶液を清澄させ、10 mM のリン酸ナトリウム、25 mM の Tris (pH 6.8) 内で予備平衡化された 5  $\times$  4 cm の DEAE セファロースカラム上に装入了。かかる緩衝液 300 ml でカラムを洗浄し、次に同じ緩衝液系内で 700 ml、0~0.6 M の塩化ナトリウム勾配で溶離させた。CSF-1 は、約 120 mM の塩化ナトリウムで溶離した。次に、1 M の最終濃度まで 95 ml の DEAE ブールに対し硫酸アンモニウム 14 M の原料 (ストック)、pH 7.0 を加えた。次に Nalgene の 0.45 ミクロンのフィルターを通して CSF-1 をろ過し、発熱物質が除去された 1.5 M の硫酸アンモニウム、0.1 M のリン酸ナトリウム (pH 7.0) 内で平衡化された 21.5  $\times$  150 mm の Bio-Rad TSK フェニル-5-PW カラム上に装入了 (4℃ で)。カラムをかかる装入用緩衝液 2 ベッド容積 (bed volume) で洗浄し、次に、硫酸アンモニウム濃度が 1.5 M から 0 M に減少しエチレンジリコール濃度が 0~6% (v/v) から増加した 45 分の勾配を用いて、0.1 M のリン酸ナトリウム (pH 7.0) で溶離させた。全ての作業は、基本的に発熱物質の無い条件の下で 4℃ で行なわれた。CSF-1 は、30% のエチレンジリコール内で約 0.6 M の硫酸アンモニウムで溶離した。次に、150 mM の塩化ナトリウムを含む 10 mM の HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 内へ CSF-1 を広範囲に透析させ、その後、Milllex の 0.45 ミクロンのフィ

ルターを通してフィルター滅菌した。

約 50 mg の精製 SCSP/N $\nabla$ 3C $\nabla$ 158 CSF-1 を得た。90% 以上の最終 CSF-1 生成物が SDS-PAGE 上で単一の種として移行し、同じ生成物は、アセトニトリル/TFA 内で RP-HPLC により分析した場合約 96% が単一種であった。比活性は約 1.5-1.7  $\times 10^4$  単位/mg であった (単位は、CSF-1 依存型細胞系を用いて単位当量を形成するコロニーとして決定され、タンパク質濃度は A<sub>280 nm</sub> を用いて決定され、0.6 という消光係数はアミノ酸化合物の決定から見積られた)。この比活性は、純化された天然の  $\text{H1a PaCa CSF-1}$  のものよりも大きくはないにせよ、少なくとも同等である。LAL アッセイにより決定される、再生され純化された CSF-1 生成物のエンドトキシン (内毒素) 含有量は、CSF-1 1 mg あたり 0.5~1 ng であった。

同様の要領で、欧州特許公報第 0272779 号に記述されているような SCSP/N $\nabla$ 2C $\nabla$ 150 をコード化する DNA から P<sub>1</sub> プロモータの制御下で生産された大腸菌タンパク質を、同様に再生させ純化させた。大腸菌を形質転換するのに用いたベクターは、N 末端 glu-glu を欠失した CSF/N $\nabla$ 2 をコード化するため適当な CSF-17 ベクターの切除された Hind III/Bst XI DNA に対し適当な合成フラグメントを置換することにより調製された。

#### C. CSF-1 に対する PEG\* -7000 の接合

第 B 節中の CSF-1 タンパク質 (SCSP/N $\nabla$ 2C $\nabla$ 150) を、100 mM の NaCl を含む pH 7.2 の 10 mM の HEPES 緩衝液の媒質内

に透析させた (1 mg のタンパク質 / ml)。PEG<sup>\*</sup> - 7000 を急速に少量の水の中に溶解させ、直ちにタンパク質溶液に付加し、これを反応中連続的に攪拌した。CSF-1 2 量体に対し 3 倍から 30 倍のモル過剰分の PEG<sup>\*</sup> - 7000 を用いた。反応は 20℃ で約 30 分、4℃ で約 3 時間で完了した。

サイズ除外 HPLC で試料を分析した。第 3 A 図は、実験に先立っての誘導体化されていない rCSF-1 (SCSF / N $\nabla$ 2C $\nabla$ 150) 試料のクロマトグラムを示している。第 3 B 図は、20℃ で 30 分間 PEG<sup>\*</sup> - 7000 の 5 倍のモル過剰分で誘導体化された後の同じ CSF-1 試料 100 $\mu$ g クロマトグラムを示している。

Stanley, R. 及び Guilbert の方法、J. Imm. Methods 42: 253 - 284 (1981 年) に従って行なわれた放射線免疫検定法は、第 3 B 図に見られる最初の 3 つの主要な吸収ピークが rCSF-1 を含んでいることを確認した。表 I を参照のこと。

分画 30, 32, 34, 36, 37, 38, 39, 41 及び 42 も同様に、本書にその開示が参考文献として内含されている Moore 他、J. Immunol. (1983 年) 131: 2397 及び Prystowsky 他 Am. J. Pathol. (1984 年) 114: 149 により記述されているマウス骨髓検定法を用いて、生物活性について分析された。表 I が、結果を示している。

は完全な R I A 免疫反応性を保持していたからである。

#### D. CSF-1 に対する PEG<sup>\*</sup> - 11000 の場合

1988 年 6 月 29 日に公開された欧州特許公報第 0272779 号の中に記述されているように構成されたベクター内での P<sub>L</sub> プロモータの制御下での大腸菌内の SCSF / C $\nabla$ 150 をコード化する構成物の発現の後、生物活性あるタンパク質を精製し再生した。使用した菌株は、プラスミド F0 / B, pPL CSF-17 asp<sub>2</sub> / C $\nabla$ 150 (ATCC Na67, 389) で形質転換された大腸菌  $\lambda$  溶原、DG116 であった。タンパク質は、単量体不溶性形態で細胞内で生産され、PCT 公報第 H0 88 / 08003 号 (前述) の中に記述されているように純化され再生された。

100 mM の NaCl を含む pH 7.2 の HEPES 緩衝液の中に、タンパク質 1 mg あたり 1 mg の割合で、この純化 CSF-1 を合計 2 mg 透析した。PEG<sup>\*</sup> 11000 を少量の水の中で急速に溶解させ、タンパク質溶液内に直ちに追加、これを反応中連続的に攪拌した。CSF-1 2 量体に対して PEG<sup>\*</sup> - 11000 の 8 倍のモル過剰分を用いた。反応は 20℃ で 30 分で完了した。この CSF-1 は、SCSF / N $\nabla$ 2C $\nabla$ 150 と PEG<sup>\*</sup> - 7000 の反応ときわめて類似した形で、PEG<sup>\*</sup> - 11000 と反応した。表 II が示しているように、穏やかな PEG 化 (2 量体 1 つあたり 1 ~ 2) はここでも生物活性に対しわずかな影響しか及ぼさなかったが、一方高度に変更されたブールの活性は著しく低下した。

表 I

PEG<sup>\*</sup> - 7000 での誘導体  
クロン : SCSF / N $\nabla$ 2C $\nabla$ 150

分画 # a	骨 髄	R I A <sup>1</sup>	比 率 <sup>2</sup>
30	0	215000	0
32	51900	288,000	0.18
34	175,100	576,000	0.30
36	210,700	454000	0.46
37	522000	886000	0.59
38	809300	445000	1.82
39	660,000	348000	1.90
41	1281,000	800,000	1.60
42	1,048,000	>1,000,000.-	N D

a. 分画は、約 1000 RIA U / ml まで希釈した後に検定された。

1 単位 (ユニット) 数 / ml

2. 生物活性比 = 生物検定を R I A で除したもの。

N D 測定せず。

表 I の結果及び以下の結果をみると、未反応の rCSF-1 及び、誘導体化された rCSF-1 の最小分子量ピークがほぼ完全な生物活性 (実験誤差内で) を保持したことがわかる。より大きい種は、はるかに小さい残留生物活性を保持した。PEG<sup>\*</sup> - 7000 との反応は、明らかに CSF-1 の放射線免疫検定 (RIA) 反応性に著しい影響を及ぼさなかったが、これは、分割されていない誘導体化された rCSF-1 がタンパク質 1 mg あたりほ

表 II

PEG<sup>\*</sup> - 11000 及び PEG<sup>\*</sup> - 7000 での rCSF-1 の  
誘導体化の比較

PEG 化の範囲	PEG <sup>*</sup> 7000 生物活性 % (誘導体化されていない SCSF / N $\nabla$ 2C $\nabla$ 150 と比較 した場合)	PEG <sup>*</sup> - 11000 生物活性 % (誘導体化されていない SCSF / C $\nabla$ 150 と比較した 場合)
多 数	0 - 20	8 - 11
CSF-1 2 量体 1 つあたり 1 ~ 2	100	90 - 100

1 SEC-HPLC 及び SDS-PAGE により計測された見かけの固有分子量から見積ったもの。

第 4 図は PEG<sup>\*</sup> - 11,000 で誘導体化された rCSF-1 (SCSF / C $\nabla$ 150) 8 mg のサイズ除外 HPLC クロマトグラムを示している。図中に示されているようにブールされた種やかに誘導体化された分画は、基本的に完全な生物活性を保持し、サイジング時点で 80000 ダルトン又還元されない SDS-PAGE 上で 45000 ダルトンの見かけの分子量で移動することがわかっている。この分画は、約 20% の全体的収量で回収された。

これら 2 つの技術により見積られた PEG-CSF のサイズの差異は、その他のものにより行なわれた観察と一貫している。PEG は、SDS と結合するタンパク質の能力を変え、SDS-PAGE 上での移動度に影響を及ぼすことができる。又、PEG は、カラムマトリクスとの疎水性相互作用などによってサイズ除外見積りにも影響を及ぼしうる。

リムルスアノーバ様細胞リゼイト (LAL) 検定法により検定されたこの試料の内毒素レベルは、280 ng (A<sub>900</sub> 単位) の

タンパク質で1吸光単位あたり1ng未満であることがわかった。[LAL検定法は、Associates of Cape Cod Inc., Woods Hole, MAから入手可能なPyrotestブランドについての製品カタログ(1982年)により記述されている: 又これはWatson他(eds)「エンドトキシン及びリムルスアメーバ細胞リゼイトテストによるその検出」、エンドトキシン基準及び細胞外投与薬でのリムルスアメーバ細胞リゼイトの使用に関する国際会議議事録、Alan R. Liss Inc., ニューヨーク(1982年)及びLevin他(1964年)Bull Johns, Hopkins Hosp., 115: 265によっても記述されている)。

#### E. CSF-1に対するPEG<sup>\*</sup>-4800の接合

PEG<sup>\*</sup>-4800とクローンSCSF/CV150からのrCSF-1と反応させるために、PEG<sup>\*</sup>-11000の場合と同じ条件が用いられた。CSF-1をうまく誘導体化し、穏やかに誘導体化されたブール(1つ又は2つのサイトにて)は基本的に完全な生物活性を保持した。

#### F. ラットにおける未修飾CSF-1とPEG化されたCSF-1の薬理動態

平均体重が161gの3匹の雄のラット(Charles River Breeding Labs, Wilmington, MA)に対し、第8図に示された前述のSCSF/CV150クローンからのPEG<sup>\*</sup>-11000誘導体化されたCSF-1の穏やかに誘導体化された分画を体重1kgあたり1mgの割合で、尾の静脈内に注射した。留置カテーテルにより血漿試料を収量し、RIAによりCSF-1の力価を測定した。0分、30分及び120分の時点で尿試料を収量し検定した。

ブロッティング法は、かかる方法により検出されたrCSF-1抗原が見かけ上無偏で2量体でありかつ、注入された物質と同じサイズを有することを確認した。

#### 例 II

第2の結合方法による活性化されPEG化されたCSF-1の調製

##### A. PEGエステル調製の調製

##### 1. mPEG-5000のカルボキシメチル誘導体を調製した。

ベンゾフェノンナトリウムから精製されたばかりのテトラヒドロフラン(THF)約20ml中に0.64gのナフタレンの溶液に対して0.15gのNaを加えることにより、ナトリウムナフタレンを調製した。平均分子量5000のモノメチルポリ(エチレングリコール)(「mPEG5000」)をP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>の入った真空乾燥器の中で一晩乾燥した。50mlまでの乾燥THF(精製されたばかりの)中に2.5gのmPEG5000の溶液に対してNaナフタレン溶液を滴下した。過剰を示すべく溶液内に緑色が持続した時点で、塩基の付加を止め、1.2mlのBrCH<sub>2</sub>COOCH<sub>3</sub>を滴下した。緑色は消え、混合物は曇った。この混合物を一晩室温で攪拌した。曇った混合物を、約70mlの低温エーテルの入ったフラスコに注ぎ込んだ。真空ろ過により沈殿物を収量し、エーテルで洗浄した。乾燥した固体を75mlの1MのNaOH内で溶解させ、室温で2.5時間攪拌してメチルエステルを加水分解した。HClを加えてpHを約3に調整し、溶液を回転式蒸発器で濃縮させた。残留物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>内にとり込み、約1時間攪拌した。不溶性物質をろ過して除去し、溶液をエーテル内

グリコシル化された522アミノ酸前駆物質(LCSF)から生じる哺乳動物の細胞(COS)内で発現される誘導体化されていないrCSF-1とrCSF-1を用いて、付加的なデータも収量した。未修飾のCSF-1を用いた実験においてラットの平均体重は178gであり、未修飾CSF-1を体重1kgあたり125μgの割合で注射した。その他の条件は全て同じであった。

第5図は、修飾及び未修飾CSF-1タンパク質の血液浄化の時間的推移を比較している。血漿曲線の下面積で用量を除することにより全身浄化値が計算される。このデータにより、血液中の誘導体化されたrCSF-1の全身浄化値は、誘導体化されていないrCSF-1の3.84ml/分/kgに対し、0.302ml/分/kgであることがわかる。このことはすなわち誘導体化されていないタンパク質に比較した場合誘導体化されたタンパク質の滞留時間が12.7倍延びていることを表わしている。第6図は、誘導体化されたCSF-1(SCSF/CV150)の注射から120分後のラットの血漿のサイズ除外HPLCを示している。この図によると、血漿内のRIA検出可能なrCSF-1シグナルの静脈内注射から2時間後の見かけのサイズが43-80kdであったことがわかる。この観察は、薬理動態の実験(120分)において測定されたRIAシグナルが無傷のPEG-rCSF-1及びrCSF-1を表わしていることを示唆している。Burnette技法(1981年)、Anal. Biochem. 112: 195-203による(CSF1フラグメントを検出することのできる組換え型CSF-1とそれに続く<sup>125</sup>Iタンパク質Aに対する抗血清を用いて開発されたもの)尿及び血漿の非還元SDS-PAGEゲルのウェスタン

に注ぎ込んだ。真空ろ過で固体を収量し、これをエーテルで洗浄しP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で真空乾燥器内にて乾燥させた。こうして、望まれたカルボキシメチルmPEG-5000酸が生み出された。この酸を滴定して、完璧な変換が起こったことを立証した。さらに大きな規模でカルボキシメチルmPEG-5000の調製をくり返した。沈殿物を収量し乾燥させた。収量は8.5g。滴定は約102%の酸を示した。かかる実験についての参考文献はBuckmann他、Makromol. Chem. 182: 1379(1981年)である。

##### 2. カルボキシメチルmPEG-5000のパラニトロフェニルエステルを調製した。

3mlのCHCl<sub>3</sub>の中に合計1gのmPEG-5000酸(2×10<sup>-4</sup>モル)を溶解させた。この溶液に対して、0.28gのp-ニトロフェノール(2×10<sup>-4</sup>モル)を加えた。溶液は薄黄色になった。次に0.041gのジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)(2×10<sup>-4</sup>モル)を少量のCHCl<sub>3</sub>内に溶解させ、室温でPEG-酸溶液に滴下した。約10分間攪拌した後、2mlのCHCl<sub>3</sub>混合物を10mlの0.01Mのリン酸塩緩衝液(pH7.0)に加えた。p-ニトロフェノール陰イオンの400nmにおける吸光度は0.02443であった。5NのNaOHを加え、A<sub>400</sub>を0.5847にまで増大させた(エステルの%は以下の公式で計算して58.2%である)：

$$\text{エステル\%} = \frac{\text{NaOH後のA}_{400} - \text{NaOH前のA}_{400}}{\text{NaOH後のA}_{400}} \times 100$$

約3時間の反応後、1mlのCHCl<sub>3</sub>混合物を1.0mlの0.01Mリン酸塩(pH7.0)に加えた。A<sub>400</sub>は0.2238であった。



50 ml の 5N NaOH を加えたところ、 $A_{400}$  は 1.154 で 80.6% のエステルを生み出した。

1 つの沈殿物、ジシクロヘキシル尿素が現われ、グラスファイバフィルターを通してこれをろ過してとり除き、CHCl<sub>3</sub> で乾燥させた。約 300 ml の無水エチルエーテルを加えることによりエステルを沈殿させた。3 時間混合物を沈殿させ、次にガラスフリットを通してろ過させた。次に CHCl<sub>3</sub> で沈殿物を再度溶解させ、約 100 ml のエチルエーテルで再度沈殿させ、中ガラスフリットを通してろ過させた。少量の湿った固体を 0.01 M のリン酸緩衝液、pH 7.0 内で溶解させた。 $A_{400}$  は 0.0240 であった。50 ml の 5N NaOH を付加すると、 $A_{400}$  は 3.330 まで増加した (エステル% は 99.3 であった)。

主沈殿物を真空乾燥器内で一晚乾燥させた。この沈殿物が入っていたフラスコを水で洗浄し、残留物を凍結乾燥させた。次に、pH 7.0 で 2 ml の 0.01 M のリン酸塩内で合計 4 mg の沈殿物を溶解させた ( $A_{400} = 0.0276$ )。50 ml の 5 N の NaOH を付加したところ、 $A_{400}$  は 3.50 であった (目盛外)。合計 200 ml の溶液を 800 ml の 0.01 M のリン酸塩 (pH 7.0) になるまで希釈させた。 $A_{400}$  は 0.7985 であった。計算されたエステル% = 99.3%。

合計 1.5 mg の凍結乾燥された残留物を、1.0 ml の 0.01 M のリン酸塩 (pH 7.0) 内に溶解させた。吸光度は 0.0680 であった。合計 50 ml の 5N NaOH を加えると、 $A_{400}$  は 1.106 (エステル% = 93.9) であった。主要沈殿物からのフィルク上の残留物を水で洗い、週末をかけて凍結乾燥させた。重量は 131 mg

### 例 III

#### 第 3 結合 (連鎖) 方法による、PEG 化された CSF-1 の調製

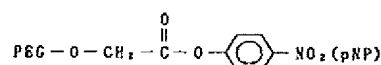
##### A 活性化された PEG エステル (PEG-PNP) の調製

低濃度のジオールしか含まない平均分子量 10000 のモノメチル PEG (m-PEG10000; Union Carbide 社) 25 グラム (2.5 m.mole) を 500 ml 入りの 3 つ口丸底フラスコ内で 250 ml の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中に溶解させた。5 グラム (25 m.mole) の p-ニトロフェニルクロロ炭酸塩 (PNP-chloroformate) と 3 グラム (25 m.mole) のジメチルアミノピリジン (DMAP) を付加した。混合物を窒素下で室温で一晩攪拌した。反応混合物をろ過して DMAP-HCl を除去し、100 ml まで濃縮させた。濃縮溶液を攪拌しながら 1 リットルのエーテルに付加した。粗凍結ガラスフィルター上で沈殿物を収集した。次に沈殿物を約 1 時間約 400 ml の塩化メチレンと共に攪拌し、次にろ過して約 100 ml になるまで濃縮した。溶液を 1 リットルのエーテルに付加することにより PEG エステルを再度沈殿させた。グラスファイバフィルターを用いて沈殿物を収集し、真空乾燥器内で乾燥させた。収量は 17.5 グラムであった。

生成物を p-ニトロフェニル炭酸塩の含有量について検定した。10 ml の 0.1 M リン酸ナトリウム (pH 8) の中に 10.3 mg ( $1.03 \times 10^{-4}$  モル) を溶解させた。400 nm での吸光度により、遊離又は未反応 p-ニトロフェニル (PNP) 不純物を測定した。初期  $A_{400}$  は 0.37 であった。1.0 ml の PEG-PNP に対し 50 マイクロリットルの 5N NaOH を加えたところ、存在する全ての

のみわみわした白色粉末であった。少量を 0.01 M のリン酸塩、pH 7 の中に溶解させ、 $A_{400}$  は 0.0859 であった。50 ml の 5N NaOH を付加した時点で  $A_{400}$  は 0.6794 であった (エステル 87.4%)

エステルの構造:



##### B. CSF-1 (asp<sub>2</sub>,SCSF/CV150) の PEG 化

前述の p-ニトロフェニルエステルを、以下のようにして例 I に記されている asp<sub>2</sub>,SCSF/CV150 の再生タンパク質とカップリングさせた。

rCSF-1 (1 mg/ml の割合で 200 μg) を、100 mM の NaCl を含む 20 mM の HEPES 緩衝液 (pH 7.2) 内に透析した。合計 0.8 mg の p-ニトロフェニルエステルを少量の水の中に溶解させ、この溶液 250 μg を直ちに SCSF/CV150 に加えた。4 時間 20℃ で接合を行ない、サイズ除外 HPLC で試料を分析した。穏やかに誘導体された rCSF-1 (CSF-1 1 つあたり 1 又は 2 の PEG 分子に相当するもの) は、マウス骨髄で検定したところ基本的に完全な生物活性を保持していた。

反応を、2 重ビームの Hewlett-Packard 分光計内のキュベット内で行なう場合、p-ニトロフェニル陰イオンの放出を監視することができ、こうしてカップリング反応は、一定の与えられた量の放出が起こった後再現可能な形で停止させることが可能となる。

エステルは加水分解され、 $A_{400}$  は 2.06 であった。秤量された全ての生成物 (10.3 mg) が PEG-PNP であったならば (すなわち遊離 PNP が全く存在しなかった場合)、理論上の最大  $A_{400}$  と呼ばれる  $A_{400} = 1.85$  を有する  $1.03 \times 10^{-4}$  モル/リットルの PNP が放出されただろう。

$$\text{従って秤量された物質の} \frac{2.06 - 0.37}{1.85} \times 100 = 91\% \text{ が実際に}$$

PEG-PNP であった。初期吸光度 (0.37) はかなり高いものであったため、遊離 PNP は見かけ上存在していた。生成物を、約 75 ml の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 内で溶解させ、1.2 リットルのエーテルを加えて沈殿させることによりさらに純化した。沈殿物を収集し、乾燥させ (15.8 グラム)、再度検定した。

$$\frac{\text{NaOH 後の } A_{400} - \text{NaOH 前の } A_{400}}{\text{理論上の最大 } A_{400}} \times 100 =$$

$$\frac{1.78 - 0.157}{1.82} \times 100 = 89\%$$

##### B. PEG 化された CSF-1 (SCSF/NVCV158) の調製

基本的に例 I に記述されているとおりに CSF-1 を生産した。CSF-1 を 0.05 M のホウ酸ナトリウム (pH 9.0) の中で約 10 mg/ml まで CSF-1 を濃縮させた。例 III, A 部から固体として得られた PEG-PNP 5 mg を CSF-1 1 ml につき付加した (約 1 : 1 M の比率)。反応を 2 時間室温で続けた。

NaCl を、約 5 M の最終濃度 (飽和) に至るまで反応混合物に付加し、フェニルセファロース (Pharmacia Fast Flow High Substitution) カラムに高塩混合物を装填した。装入さ

れた10mgのタンパク質について約1mgのフェニル・セファロースが適当であった。0.1M Tris, pH8.5内で1.2から0Mの硫酸アンモニウム勾配でカラムからCSF-1を溶離させた。

Coomassie-染色された非還元性 SDS-PAGEにより分画を分析し、NFS60生物検定での生物活性を測定した。結果は表Ⅲに示されている。プラスは、試料中の異なるCSF-1複合体の相対量を示している。生物活性データは、3回の検定の平均である。

表Ⅲ

## PEG-CSF-1複合体の生物活性

分画	存在する CSF-1 複合体	生物活性 (U/mg)
#PEGs/CSF-1	0, 1, 2, 3	
1	++++	$1.4 \times 10^4$
2	+++ ++	$1.4 \times 10^4$
3	++ +++	$8.1 \times 10^3$
4	+ ++++	$5.7 \times 10^3$
5	+ ++++	$6.1 \times 10^3$
6	++++ +	$7.3 \times 10^3$
7	+++ + +	$8.3 \times 10^3$
8	++ ++ +	$9.3 \times 10^3$
9	+ ++ ++	$6.4 \times 10^3$

例Ⅳ

## A. PEG化されたCSF-1(SCSF/NV3C V158)の調製

SCSF/NV3C V158遺伝子を含むpJN653で形質転換された大腸菌株HW22の増殖及び収量は、例Ⅰにおいて記述したとおり

する主要なPEG-CSF-1種を含んでいた。少量の未修飾CSF-1及びさらに高度に変性されたCSF-1(約10%)がブールされた生成物の中に残っていた。サイズ除外クロマトグラフィ(SEC)ブール1及び2の特徴づけは、以下の表Ⅳ及びⅤに示されている。

表Ⅳ

試料	A <sub>280</sub> 単位	収量(%)	エンドトキシン(上述の ようなAL)(タンパク質 mgあたりのng)
未修飾rCSF-1	40.0	100	0.14
ブール1, SEC	12.2	30	ND*
ブール2, SEC	6.2	15	0.43

\* 行なわず

表Ⅴ

1依存型 試料	RIA(前述のと おり)(「単位」 /A <sub>280</sub> 単位)	生物検定(CSF-1依存型細胞 系使用)(単位 /A <sub>280</sub> 単位)	生物検定(CSF-1 細胞系使用) (単位/mg)
未修飾rCSF1	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$
ブール2, SEC	$2.7 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$

## B. PEG化されたCSF-1(SCSF/NV3C V158)の薬理動態

PEG化されたCSF-1とされていないCSF-1の両方についての用量が6mg/kgである点を除いて、本例の第A節で記述されているCSF-1とPEG-CSF-1の3匹のラットにおける平均静脈内浄化を見積るために、例Ⅰに記されているものと同じ条件が用いられた。

第7図は、静脈内注射後の時間数と3匹のラットの血液から

であった。

次に屈折体懸濁物を、同様に例Ⅰに記されているとおりに可溶化し、再生し精製させた。最終比活性は、CSF-1依存型細胞系統について行なわれたCSF-1生物検定において約 $1.5 \times 10^4$ 単位/mgであった。

10mMのHepes緩衝液(pH7.5)及び100mMのNaCl中で2.6mg/mlの濃度で、上述の再生されたCSF-140mgを20℃で撹拌しながら保温した。200μlの精製水内にPEG"-11,000を溶解させ、CSF-12量体に対してPEG"-11000の11倍のモル過剰分でCSF-1溶液に直ちに付加した。(PEG"-11000は約55%加水分解されておらず、活性であった。30分の保温の後、1Mの原料(ストック)溶液からPEG"-110001モルにつき2モルのε-アミノカプロン酸塩を加えて、反応を停止させた。Amicon Centricon-30遠心分離により試料を6mlまで濃縮させ、3回の同じ2ml装入ランでサイズ除外HPLCにより純化させた。使用したカラムは、0.2MのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>緩衝液(pH7.0)内で平衡化されたBio-Sil®TSX-250, 600×21.5mm(BioRad)であった。

3回の試行における穏やかにPEG化されたタンパク質のA<sub>280</sub>ピークをブールし(ブール1, SEC)、最終的な2ml体積まで濃縮させ、これを同じカラム上で再注入させた。活性のPEG化された分画をブールし濃縮させた。

出発物質の15%を占める最終ブール(ブール2, SEC)は、未修飾CSF-1の初期生物活性の約100%を有する6mgのCSF-1から成り、SDS-PAGE上で約45kの見かけのMrで移動

らのCSF-1の相対的濃度の関係を表わす曲線を示している。浄化は、PEG化されたCSF-1については約0.63ml/分/kgでありPEG化されていないCSF-1については7.50ml/分/kgである(5分に対し3時間)ことがわかった。このことは、PEG化された分子について血液内平均滞留時間の約12倍の増大を表わしている。

例Ⅴ

## PEG/CSF-1複合体の硫酸アンモニウム分別

## A. 小規模

0PEG-CSF-1(未接合CSF-1), 1PEG-CSF-1(CSF-11モルあたりPEG1モル), 2PEG-CSF-1(CSF-11モルあたりPEG2モル), 3PEG-CSF-1(CSF-11モルあたりPEG3モル)及び4PEG-CSF-1(CSF-11モルあたりPEG4モル)を含む10mlの反応混合物は、タンパク質1mgあたり約1mgであった。約1.3Mまで、固体(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を付加した。沈殿物を形成させ、10000rpmで10分間遠心分離により除去した。沈殿物(ペレット)を貯え、約1.4Mで濁るまで上澄みに対し(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えた。沈殿物を遠心分離でとり除いた。この手順を続行し、約1.5, 1.6及び1.7Mで付加的な(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>カットを行なった。0.1MのTris pH8.6内で沈殿物を再度懸濁させた。沈殿物のSDS-PAGE分析は、1.7Mの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の沈殿物における未接合CSF-1の濃縮及び1.5及び1.6Mの沈殿物における1PEG-CSF-1種の濃縮を示した。1PEG-及び3PEG-CSF-1も存在していたものの、1.4Mの沈殿物の中での優占種は2PEG-CSF-1であった。表Ⅵ

は、Coomassie染色された非還元性 SDS-PAGEにより分析された場合の、増大する  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  濃度の沈殿物 (ペレット) 内のさまざまな CSF-1 の相対量を示している。CSF-1 複合体を1種以上含む分画の反復的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分別の結果、基本的に純粋な未接合 CSF-1 及び IPEG-CSF-1 が得られた。この反復は同様に、ほぼ純粋な 2PEG-CSF-1 又は 3PEG-CSF-1 を生産するためにも用いることができる。

表 VI

PEG-CSF-1 接合体の硫酸アンモニウム分別					
分 画	存在する CSF-1 接合体 (#PEGs / CSF-1 2 量体)				
	0	1	2	3	4
1.3 M	+	+	+	+	+
1.4 M	+	+	++	+	
1.5 M	+	++++			
1.6 M	+	++++			
1.7 M	+++++				

## B. 大規模

例Ⅲに従って約 1 g の CSF-1 (SCSF/N $\nabla$ 3C $\nabla$ 158) を接合させた。第A部に記されているような  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  による分別の後、1つのPEGに対して接合された CSF-1 2 量体の分子量をもつ CSF-1 約 600mg を純化した。この接合体は約  $6.2 \times 10^7$  U/mg の比活性を有していた。結合された1つ、2つ又は3つのPEGを有する CSF-1 の混合物約 80mg も又回収され、これは約  $3.2 \times 10^7$  U/mg の比活性を有していた。

## 例 VII

PEG化された CSF-1 (SCSF/N $\nabla$ 3C $\nabla$ 158) の生体内効力：細菌感染モデル

例Ⅲに記述されている SCSF/N $\nabla$ 3C $\nabla$ 158、例Ⅲに記述されているとおりに調製されたPEG化された SCSF/N $\nabla$ 3C $\nabla$ 158 又は食塩水 (対照グループ) を、5匹のマウスから成るグループに対し第1日目に (致死量の大腸菌 SM18 に感染させる前日) 腹腔内注射した。2つの CSF-1 用量グループ (マウス1匹あたり 10 $\mu$ g と 50 $\mu$ g) を用いた。第0日目に、致死量 ( $5 \times 10^7$  細胞) の大腸菌 SM18 を全てのマウスに腹腔内注射した。生きのびたマウスの数を5日間にわたり追跡調査した。結果は下表に示されている。

表 VII

経過日数別の生存マウス数						
	1	2	3	4	5	6 (日目)
対照 (食塩水注射)	2	0	0	0	0	0
未修飾 CSF-1						
10 $\mu$ g	3	2	2	2	2	2
50 $\mu$ g	3	3	3	3	3	3
PEG化 CSF-1						
10 $\mu$ g	2	2	1	1	1	1
50 $\mu$ g	5	4	3	3	3	3

結果は、生存率に対する rCSF-1 の用量依存型効果が存在することを示している。変更 CSF-1 と未変更 CSF-1 の間でのこの単一の実験における効力のわずかな差は、充分有意

## 例 VI

PEG-IL-2 接合体の硫酸アンモニウム分別

## A. アミドリンカーを有する PEG-IL-2 接合体

基本的に1988年11月17日に公示されたPCT特許公報第W0.88/08849号に記されているように生産され純化され、基本的に米国特許第7,766,106号に記述されているようにPEG化された約12mgのIL-2を、1mlの1.0M Tris pH8内です度懸濁させた。溶液が濁るまで固体の  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を付加した。試料を12分間12000rpmで遠心分離した。沈殿物 (ペレット) を0.1MのTris pH8.6内で再度沈殿させた。例Vに記述されているように  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分別を続行し、再沈殿した沈殿物 (ペレット) の SDS-PAGE 分析は、未接合 IL-2 を接合 IL-2 から分離できることを示していた。さらに、CSF-1 について例Vに記述されている結果と同様に、IPEGに対して複合されたIL-2について濃縮された分画が得られた。特定の複合体について濃縮された分画の再循環が、結果としてほぼ純粋な複合体をもたらすものと予想される。

## B. ウレタシンリンカーを有する PEG-IL-2 接合体

1989年1月20日に提出された同一所有権者の同時係属米国特許出願第 号に記述されている手順により、PEG-IL-2を得た。ここで記述するウレタシンリンカーを介してPEG部分をIL-2に付着させた。基本的に例V第A部及び例Vに記述されているとおりの  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沈殿の結果、さまざまな PEG-IL-2 接合体の分別が得られた。

なものではない。CSF-1のPEG化は、このプロトコルにより検知された効力を減少させず、又、当該実験において観察可能な薬物依存型毒性を増大することもなかった。

## 例 VIII

## 抗腫瘍効力についての接合 CSF-1 の生体内試験

## A. Meth (メチオニン) A肉腫モデル

7日前にMeth A肉腫を皮下移植したマウス (1グループにマウス10匹) 1匹1回あたり最高50 $\mu$ gの用量で、PEG化されたCSF-1を腹腔内、皮下又は静脈内 (i.p., s.c., i.v.) 注射した。投薬計画は、使用された特定のPEG化CSF-1調製により左右される。CSF-1処置の開始以後14日間、腫瘍の大きさを追跡調査する。CSF処理されたマウス及び対照処理されたマウスにおける時間の経過につれての腫瘍の大きさの平均的变化を比較することによって、結果を評価する。  
\* ( $\Delta TV$  = 単一のマウスグループ内の第0日目の平均腫瘍体積に対する指定の日における平均腫瘍体積の比)。

## B. B16転移モデル

B16のネズミ黒色腫細胞系内の転移を防ぐためPEG化CSF-1を用いた第2の生体内腫瘍モデルも同様に有用である。

0.2mlのCa<sup>++</sup>及びMg<sup>++</sup>を含まないHBSS内で懸濁された1-10 $\times 10^4$ の腫瘍を、麻酔をかけていないマウスの尾の側静脈に接種する。腫瘍細胞の接種後14日から21日目に、マウスを安楽死させ、剖検する。剖検の間、肺と脳を除去し、水で洗浄して秤量する。次に肺をブアン溶液内で固定し、一對の

肺についての表面腫瘍小結節の数を解剖顕微鏡を用いて見極める。

例Ⅱに従って調製され、 $1-25 \times 10^3$  U/mgの潜在能を薬学的に受容可能なエンドトキシンレベルを有するPEG化された組換え型ヒトCSF-1を用いる。CSF-1は、実験毎に直前に凍結原料（ストック）から得たばかりのものであり、USP0.9%食塩水内で注射直前に希釈される。PEG化されたCSF-1は、使用される特定のPEG化CSF-1調製に応じた計画に基づいて、静脈内、腹腔内又は皮下注射させる。使用される投薬レベルは、最高5 mg/kgまでである。非特異的で非治療的なタンパク質から成る陰性対照としては、USPヒト血清アルブミン(HSA)又は煮沸したPEG化CSF-1を用いる。PEG化CSF-1は、CSF-1活性を不活性にするため30分間煮沸される。

効力データは、PEG化CSF-1が肺転移の中央数を著しく減少させるということを立証している。

#### 例Ⅲ

##### PEG化CSF-1を用いたCMV感染の生体内処置

致死量のサイトメガロウイルス(CMV)に感染させる2日前から始めて、異系交配のC D-1マウスに、最高400 µg/kgの用量でPEG化CSF-1を、腹腔内、静脈内又は皮下注射する。投薬計画は、使用される特定のPEG化CSF-1の調製により左右される。マウスは、感染後3日目に安楽死させ、脾臓といった標的器官内のウイルス複製の範囲をブランク測定法で評価する。結果は、PEG化CSF-1での処置を

受けたマウスが、食塩水での処置を受けたマウスに比べて器官ウイルス力価を著しく下げたことを示しており、これはすなわちPEG化CSF-1で処置されたマウスにおいてCMV感染が比較的軽度であることを表わしている。

別途に、異系交配されたC D-1マウスにおいて、致死量のネズミCMV感染モデルでのPEG化CSF-1をテストすることが可能である（これは、器官力価を監視している亜致死量のCMVを用いた前述の実験と対照的である）。ウイルスの攻撃誘発より最高24時間前に始めて、最高4 mg/kg（マウス一匹あたり）の用量でマウスにPEG化CSF-1を腹腔内、皮下又は静脈内投与した場合、食塩水で処置された対照に比べて生存率の著しい増大がみられる。

従って、PEG化CSF-1は、ウイルス感染全般の治療において単独で或いは又もう1つのリンフォカインと組合わせた形で使用でき、特に、後天性免疫不全症候群(AIDS)といった免疫抑制ウイルス感染において有益でありうる。

#### 例Ⅳ

##### 白血球数の生体内シミュレーション

使用するPEG化CSF-1の調製によって異なるさまざまな投薬計画に基づき一回の投与あたり最高約2 mg/kgの量で、例Ⅱに記述されているようにPEG化された純化された組換え型ヒトCSF-1を、異系交配のC D-1マウスに投与する。合計の白血球数、好中球数、単球数及びリンパ球数を測定する。これらのパラメータのうちのいずれかにおける増加は、果粒細胞又は単球の生産の刺激及び白血球数の増強構造（エ

ンハンサー）として臨床医学及び獣医学の分野で有用である可能性がある。

#### 例Ⅴ

##### 創傷治ゆにおけるPEG化CSF-1

移植されたゴアテックス管が侵入マクロファージ、線維芽細胞及びその他の結合組織細胞及びコラーゲン及びフィブリン沈着で一杯になる、Goodson及びHunt, 1982年、*J. Surg. Res.*, 33:394のゴアテックスミニチュア創傷治ゆモデルといったプロトコル及び動物モデルを用いて、PEG化CSF-1を創傷治ゆについて検定する。治ゆは、顕微鏡で管の内容物を検査することにより評価される。第2のモデルは、Eisenger他、1988年、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1937の切開創治ゆモデルであり、ここでは、創傷は目で観察され、治ゆ、細胞密度及び毛包から発生する表皮細胞層数を監視するためパンチ生検（細切採取法）が行なわれる。同様に実験の終りには、創傷の破断強度が測定される。第3のモデルは、傷害部位の中皮再生度によって、定められた断面内の治ゆが評価されるような、Potev, 他、1987年、*J. Pathol.*, 151:209の火傷を受けた精巣漿膜といった漿膜モデルである。これらのモデルの各々による教示は本書に参考文献として内含されている。

一般に、PEG化CSF-1は、局所的創傷についての表皮細胞誘導因子(EDF)を用いた切開創治ゆモデルの参考文献中に記述されているような無菌条件下で食塩水中に最高PEG化CSF-1 1 µgあたり1000000 U/mgの量で非付着性外科包

帯を浸漬させることにより、創傷部位に適用される。代替的には、同量のPEG化CSF-1を、Goodson及びHunt（同書）に記述されているような移植の時点でゴアテックス管内に導入する。或いは又、PEG化CSF-1を低速放出マトリクス内に内含させて創傷部位に（ゴアテックス管内、包帯内又は包帯下又は漿液窩内注入により）適用することもできる。又、PEG化CSF-1は、最高1000 µg/kg/日の用量で全身的に（静脈内、腹腔内又は皮下）投与される。

各モデルの治ゆ速度を測定し、PEG化CSF-1が存在する場合又は存在しない場合の組織の修復を評価する。

PEG化CSF-1は、EDF、表皮細胞成長因子(EGF)、線維芽細胞成長因子（塩基性及び酸性PGF）、血小板誘導成長因子(PDGF)又は転写転換成長因子(TGFアルファ及びベータ)といった創傷治ゆを促進するその他の成長因子、IL-1（インターロイキン1）及びその他のソマトメジンCやビタミンCといった物質と組合せて用いることもできる。

#### 例Ⅵ

##### PEG化されたLCSFの調製

##### A. 接合

PEG<sup>TM</sup>-11000は、例ⅠAに記されているとおりに調製した。1988年10月20日に公示されたPCT公報NO 88/08003号内に開示されている発酵純化及び再生手順に従って、CSF-1(LCSF/KN 33C 221)を調製した。5 mgのLCSFを、50mMのNaClを含むHEPES緩衝液(pH7.5) 20mM内に透析した。LCSF 2量体に対し6倍のモル過剰分でPEG<sup>TM</sup>-11000を加えた。

20℃で攪拌している2 mg/mlのLCSF溶液に対し、乾燥した活性化PEGを付加した。Zorbax GF250(Dupont社)上のサイズ除外HPLC(SEC)により10分毎に反応混合物のアリコート进行分析した。PEGに対して10倍のε-アミノカプロン酸塩過剰分を付加することで、反応を停止させた。表Ⅴは、PEG-LCSF反応混合物のNFS60生物検定データを示している。

2 mg/mlのM-CSFを含む試料を、12 mg/mlのBSAを含むPBS内に希釈させ、NFS60検定法で検定した。値は、各試料の段階希釈について行なわれた重複測定の平均を表わしている。

表Ⅴ

PEG-LCSF/NV3V221のNFS生物検定

試料	U/ml CSF-1活性
出発物質	3.65×10 <sup>7</sup>
10分+PEG	2.51×10 <sup>7</sup>
20分+PEG	3.30×10 <sup>7</sup>
30分+PEG	1.68×10 <sup>7</sup>

PEG化反応のサイズ除外分析は、30分の反応の後の2つの主要なPEG-CSF種を示した。そのサイズは、CSF-1 2量体1モルあたり1モル及び2モルのPEGのおおよその誘導体化と矛盾していなかった。45分後のSECプロファイルは、約30分で反応が完了したことを示していた。

#### B 未修飾LCSFからのPEG-LCSFの分離

試料を1 MのTris-HClでpH 8.3にまで調整し、30 mMまでの塩濃度を引き出すため分別ろ過し、Bio-Gel®TSK-DEAE

-5-PH HPLC 75×7.5 mmのカラムに適用した。カラムを30 mMのTris-HCl, pH 8.5内で平衡化させ、0から0.6 M NaClの40 min 勾配で展開させた。全ての緩衝液は、発熱物質を除いた水で調製し、HPLAシステムは予め0.1 MのNaOH及び50%のエタノールで洗浄し、エンドトキシンを除去した。カラム外の分画をSDS-PAGEで分析した。PEG化された種は、未修飾CSF-1よりも早くカラムから溶離した。カラムの開口部内にも、或る程度のPEG-CSFが現われ、この物質は、カラムへ再度適用しても再度結合しなかった。結合しなかった分画も同様に、放出されたNH<sub>4</sub><sup>+</sup>イオンを含んでいた。

#### その他の実施例

本書中の反応は、ポリビニルアルコール又はポリオキシエチル化ポリオールを用いても行なうことができる。活性PEG-CSF-1は次のように調製できる。

分子量5000のポリオキシエチル化グリセロール(PGG)は、Polysciencesから入手可能である。PGG 10 gに対し、2.28 gのグルタル酸無水物(POGに対し10倍の過剰分)を加えることができる。この混合物を2時間110℃で攪拌し、冷却することができる。これを20 mlのCHCl<sub>3</sub>の中に溶解させ、激しく攪拌しながら500 mlのエーテル内にゆっくりと注ぎこむ。生成物を収集して、エーテルで洗い、約90%のPOG-グルタル酸生成物を生み出すことができる。この生成物を例1Aで記述されているようにN-ヒドロキシスクシニミドと反応させ、活性エステルPOG-グルタリルN-ヒドロキシスクシニミド(POG")を生み出す。次に上述のCSF-1タン

パク質のうちの1つをPOG<sup>\*</sup>と反応させることができる。

CSF-1に対する接合のための活性化されたポリビニルアルコールを調製するのにニトリル置換のポリビニルアルコールも使用できる。

#### 寄託

PCT公報 NO 86/04607 号及び欧州特許公報 0272779号により詳しく記述されている以下の培養物は、Cetus Master Culture Collection(CHCC), 1400, Fifty-Third Street, Emeryville, CA, 94608 USA及びAmerican Type Culture Collection(ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852 USAに供託された。供託された試料のCHCC及びATCCの受入れ番号及びATCC寄託年月日は以下のとおりである。

培養物呼称	CHCCNo	ATCCNo	ATCC供託年月日
大腸菌DG98中のファージpHCSF-1		40,177	1985年4月2日
pHCSF-1 λ Charon 4A	2312	40,185	1985年5月21日
大腸菌NM294中のCSF-17	2347	53,149	1985年6月14日
pCSF-asp <sub>ss</sub>	2706	67,139	1985年6月19日
pCSF-gl <sub>ns</sub>	2708	67,140	1986年6月19日
pCSF-pro <sub>ss</sub>	2709	67,141	1985年6月19日
pCSF-Bam	2710	67,142	1986年6月19日
pCSF-BamBcl	2712	67,144	1986年6月19日
pCSF-Gly <sub>ss</sub>	2762	67,145	1986年6月19日
pDBCSF4 (又はpDBhuCSF-4)	2894	67,250	1986年10月24日
NM294中のpPhoA-LCSF/CV221	3084	67,391	1987年4月14日

培養物呼称	CHCCNo	ATCCNo	ATCC供託年月日
DG116中のO/E <sub>2</sub> P <sub>1</sub> LCSF/NV3CV221	3095	67,390	1987年4月14日
DG116中のO/E <sub>2</sub> P <sub>1</sub> LCSF-17asp <sub>ss</sub> /CV150	3044	67,389	1987年4月14日
DG116中の <sub>2</sub> P <sub>1</sub> CSF-17asp <sub>ss</sub> /CV150	2946	67,383	1987年4月7日
pJN653	3204	67,561	1987年11月12日
NH22中の(SCSF/NV3CV158)			

上記寄託は、ATCCと本特許出願の譲受人であるCetus Corporationの間の契約に基づき行なわれたものである。ATCCとの契約は、寄託又は刊行物を記述し識別する米国特許の発行或いは何らかの米国又は外国特許出願明細書の公開のいずれか先に発生した方の時点でかかるプラスミドの後代及び細胞系を一般大衆に対し永久に利用可能な状態におくこと、ならびに、35 USC § 122 及びそれに基づく特許局長規則 (37 CFR § 1.14 特に88606638を含む)に従って米国特許局長が権利有りと認めた者に対してかかるプラスミドの後代及び細胞系を利用可能な状態におくことを規定している。本出願明細書の譲受人は、供託中のプラスミド及び細胞系が適切な条件下で培養されている間に死滅又は損失した場合、通知に基づいて同じプラスミド及び細胞系の存続可能な培養ですみやかにこれらを置換することに同意した。

要約すると、本発明は、異なる化学リンカーを用いて異なるサイズの水溶性重合体で選択的に誘導体化されたさまざまな組換え型CSF-1分子を提供するものと考えられている。

CSF-1 の誘導体化は、CSF-1 の見かけの分子量を増大させ、ラットの血漿中のその生体内半減期を増大させる。誘導体化は又、生理学的 pH での水性媒質中の CSF-1 の可溶性も増大し、集合体を減少又は除去するか又はその抗原決定基を遮へいすることによってその免疫原性を減少させることができる。

上述の明細は、当業者が本発明を実施できるのに充分なものであると考えられる。供託された実施例は本発明の一態様の単なる一例として示されているものにすぎず、機能的に同等のあらゆる培養が本発明の範囲内に入ることから、本発明は、寄託された培養により範囲の制限を受けるものではない。本書中の物質の寄託は、本書に含まれている記述が本発明の最良の様式を含む全ての態様の実施を可能にするのに適切でないということの認知を成すものではなく、又、それによってそれが代表する特定のな例にクレームの範囲が制限されることになると考えてはならない。実際、薬学製剤の分野又はそれに関連する分野の当業者にとっては明白な本発明の上述の実施態様のさまざまな変更が、以下のクレームの範囲内に入るものと意図されている。

FIG. 1-1

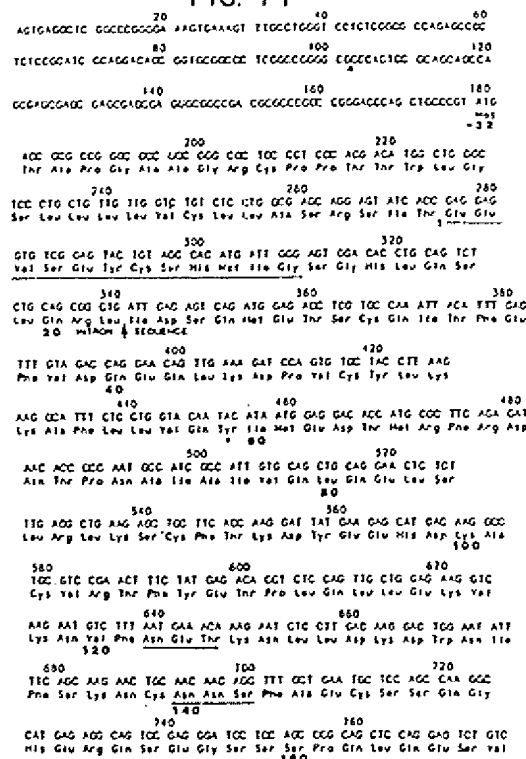


FIG. 1-2

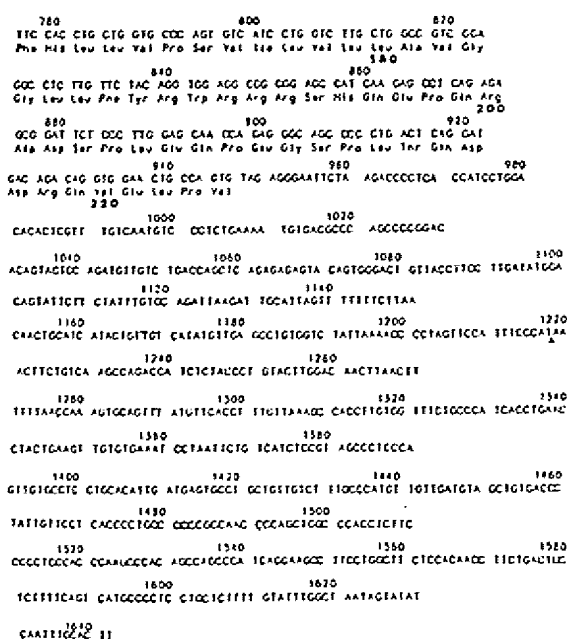
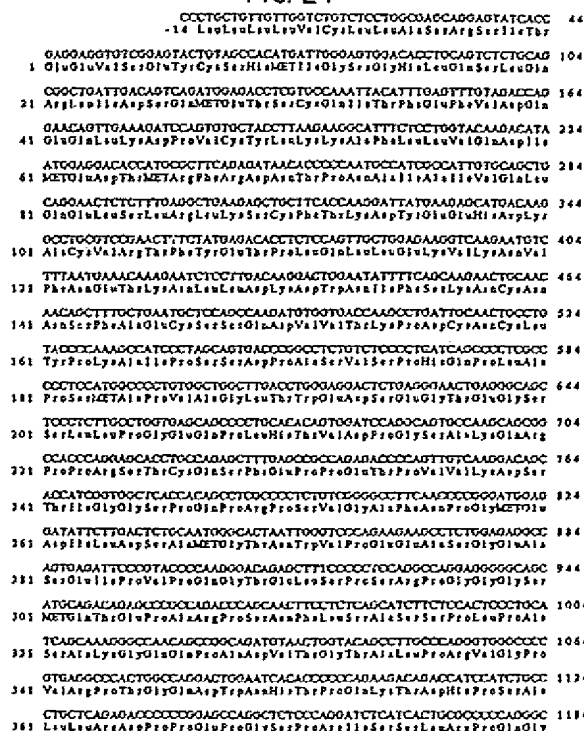


FIG. 2-1



[illegible]

FIG. 2-2

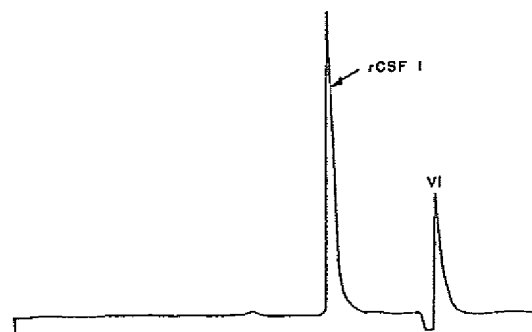


FIG. 3A

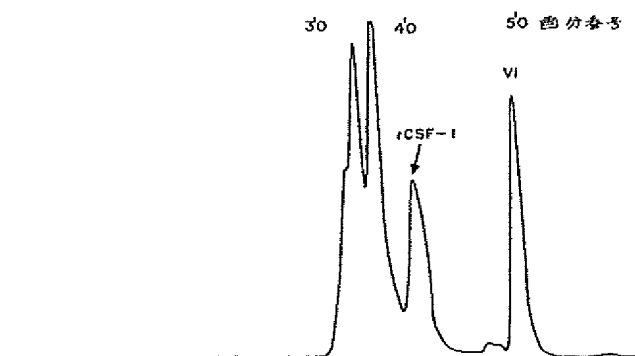


FIG. 3B

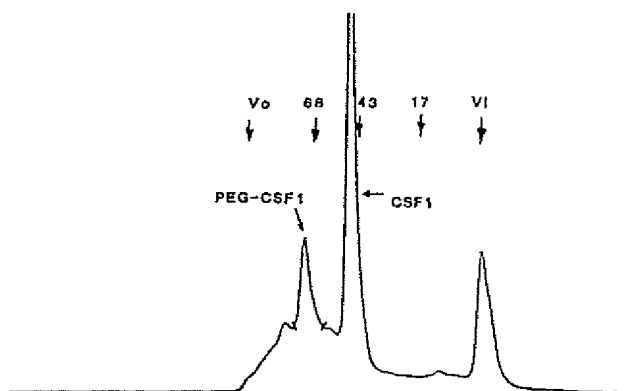


FIG. 4

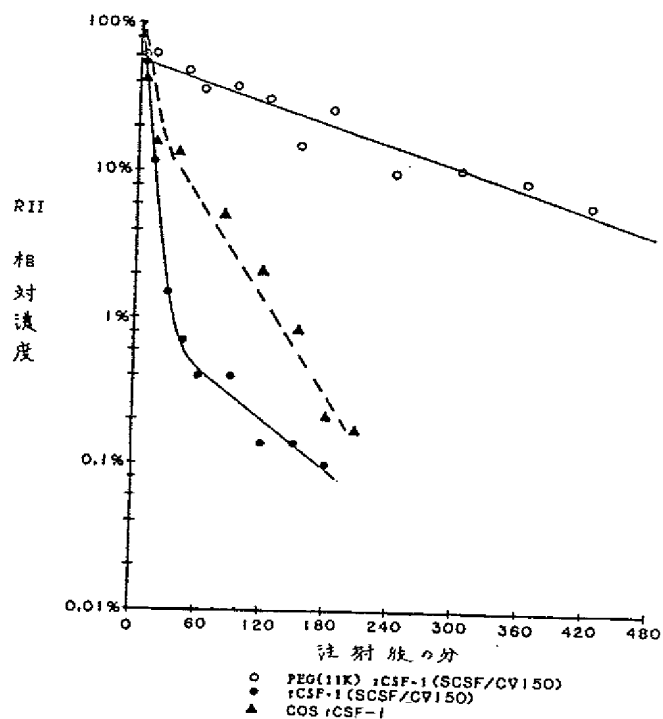


FIG. 5

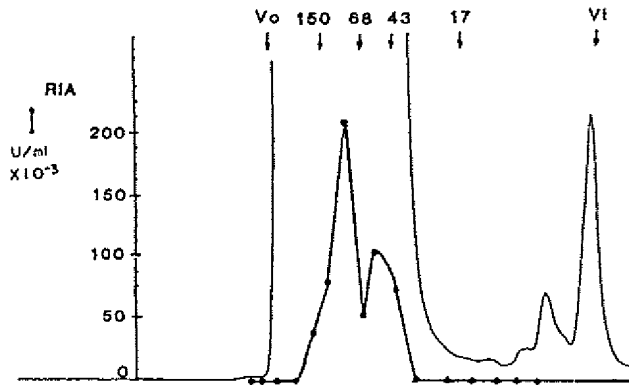


FIG. 6

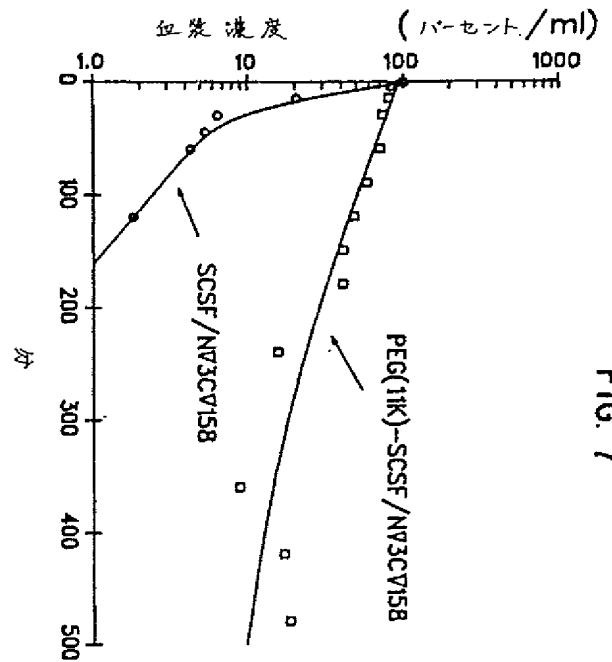


FIG. 7

手続補正書(方式)

平成3年 6月 7日

特許庁長官 植松 敏 殿

1. 事件の表示

PCT/US89/00270

2. 発明の名称

ポリマーとコロニー刺激因子-1との接合体

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 シタス コーポレイション

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 3504-0721

氏名 弁理士 (6579) 青木 朗

(外4名)

5. 補正命令の日付

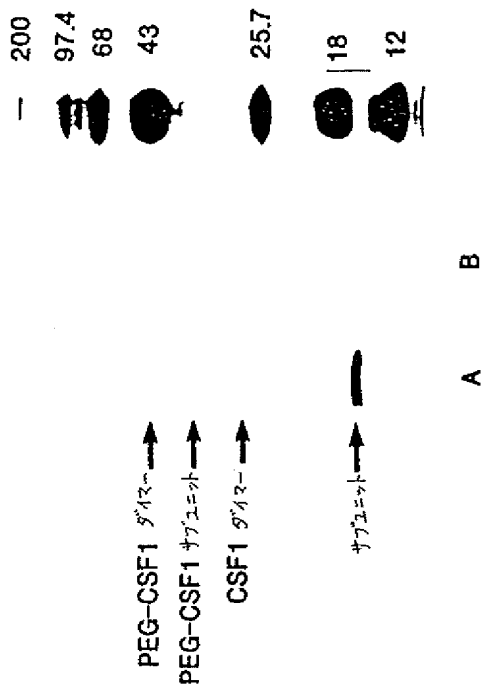
平成3年5月14日(発送日)

修正メモ済

方式  
審査



FIG. 8 11K Peg-rCSF1 フォールの SDS-PAGE 分析





特表平3-503759 (26)

国際調査報告

International Application No. PCT/US 89/00270

8. 補正の対象

- (1) 特許法第 184 条の 5 第 1 項の規定による書面の「発明の名称」及び「発明者（ヤング、ジョン ディー）の住所」の欄
- (2) 明細書及び請求の範囲の翻訳文

7. 補正の内容

- (1) 別紙の通り
- (2) 明細書、請求の範囲の翻訳文の浄書  
(但し、明細書の翻訳文第 1 頁の発明の名称以外、内容に変更なし)

8. 添付書類の目録

- (1) 訂正した特許法第 184 条の 5 第 1 項の規定による書面 1 通
- (2) 明細書及び請求の範囲の翻訳文 各 1 通

L. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (Inventor's Classification, if any, in Class 1)		
IPC: A 61 K 47/00, A 61 K 37/02		
M. FIELD CLASSIFICATION		
Classification Scheme	Minimum Documentation Required	
IPC6	A 61 K; C 12 P; C 07 K	
Documentation Search has other than Minimum Documentation in the Event that such Documents are included in the Priority Document		
N. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No. **
X	EP, A2, 0098110 (NINON CHEMICAL RESEARCH KABUSHIKI KAISHA) 11 January 1984, see page 3, line 16 - page 4, line 1; claim 3	1-3, 9, 12-17, 22-35, 39-40, 4-6, 10-11, 18-21, 37-38, 41-42
Y	WO, A1, 07/06954 (GENETICS INSTITUTE, INC) 19 November 1987, See especially pages 6-8.	4-7, 10-11, 19, 21, 37
Y	WO, A1, 85/04567 (CETUS CORPORATION) 14 August 1985, See especially the figures, claim 22.	4-8, 10-11, 18, 21, 37
<p>* Special categories of cited documents: "A" Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular interest; "X" Document which may contain elements of prior art which are not considered to be of particular interest; "Y" Document which may contain elements of prior art which are not considered to be of particular interest; "Z" Document which may contain elements of prior art which are not considered to be of particular interest.</p> <p>** Relevant to Claim No. **</p>		
<p>International Searching Authority: EUROPEAN PATENT OFFICE</p> <p>Date of Mailing of this International Search Report: 30. 05. 89</p> <p>Signature of Authorized Official: M. VAN MOL</p>		

Form PCT/ISA 210 (Rev. 1) (January 1989)

International Application No. PCT/US 89/00270

M. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No. **
X	EP, A2, 0154316 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD) 11 September 1985, See especially the abstract and claims 1-4.	1-3, 9, 12-17, 22-35, 39-40
A	Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 84, 1987 (USA) Handini V. Katre et al: "Chemical modification of recombinant Interleukin 2 by polyethylene glycol increases its potency in the murine Meth A sarcoma model.", see page 1487 - page 1491	1-43
A	GB, A, 2193631 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 17 February 1988, see the whole document	1-43
A	Science, Vol. 229, 1985 Donald Metcalfe: "The Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factors.", see page 16 - page 22	1-43

Form PCT/ISA 210 (Rev. 1) (January 1989)

International Application No. PCT/US 89/00270

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET	
<p>V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNRESEARCHABLE</p> <p>The International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:</p> <p>(1) Claim numbers 45-50 because they relate to subject matter not intended to be searched by the Authority, namely:</p> <p>Methods for treatment of the human or animal body by therapy.</p> <p>(2) Claim numbers 51-55 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to be met in order that no substantial international search is to be carried out, specifically:</p> <p>(a) Claim numbers 51-52 because they are dependent claims and are not written in accordance with the second and third paragraphs of PCT Rule 8.4(a)</p>	
<p>VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING</p> <p>The International Searching Authority found multiple inventions in this International Application as follows:</p> <p>(1) As if payment of additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchables claims of the International Application.</p> <p>(2) As if only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims of the International Application for which fees were paid, specifically claims:</p> <p>(a) No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first disclosed in the claims: 1 to 43 claimed by claim numbers 1.</p> <p>(3) As if payment of additional search fees could be searched without effecting an additional fee, the International Searching Authority did not search any of the following claims:</p> <p>(a) The International Search Report was not accompanied by applicant's payment.</p> <p>(b) No payment accompanied the payment of additional search fees.</p>	

Form PCT/ISA 210 (Rev. 1) (January 1989)

## 国際調査報告

PCT/US 89/00270

SA 27017

This report contains the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The numbers are as published in the European Patent Office (EPO) file on 03/03/89.  
The European Patent Office (EPO) is not responsible for the information which is merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
EP-A2- 0098110	11/01/84	JP-A- 58225025 US-A- 4609546 JP-A- 59059629	27/12/83 02/09/86 05/04/84
WO-A1- 87/06954	19/11/87	AU-D- 72890/87	01/12/87
WO-A1- 86/04607	14/08/86	AU-D- 55173/86 EP-A- 0209601 JP-T- 62501607	26/08/86 28/01/87 02/07/87
EP-A2- 0154316	11/09/85	WO-A- 85/03914 WO-A- 85/03868	12/09/85 12/09/85
GB-A- 2193631	17/02/88	DE-A- 3723781 FR-A- 2601591 SE-A- 8702907 NL-A- 8701640 JP-A- 63146828 BE-A- 8700787 JP-A- 63152326 JP-A- 63146827 JP-A- 63146826	21/01/88 22/01/88 19/01/88 15/01/88 18/06/88 27/09/88 24/05/88 18/06/88 18/06/88

For more details about this report (see Official Journal of the European Patent Office, No. 11/88)

## 第1頁の続き

⑩Int. Cl.<sup>9</sup>

識別記号

序内整理番号

A 61 K 47/48  
C 08 H 1/00

C 7624-4C

- ⑩発明者 コーツ, カーストン イー. アメリカ合衆国, カリフォルニア 94530, エル セリト, ミラ  
ビスタ ドライブ 2646
- ⑩発明者 モアランド, マーガレット アメリカ合衆国, カリフォルニア 94702, パークレイ, エベリン  
アベニュー 1320
- ⑩発明者 キヤトル, ナンディニ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94530, エル セリト, ジョー  
ダン アベニュー 6107
- ⑩発明者 レアード, ウォルター ジェイ. アメリカ合衆国, カリフォルニア 94564, ビノール, ラッセン  
ウェイ 2660
- ⑩発明者 アルドウイン, ロイス アメリカ合衆国, カリフォルニア 94402, サン マテオ, レイク  
ショア ドライブ 179
- ⑩発明者 ニテキ, ダヌーテ イー. アメリカ合衆国, カリフォルニア 94709, パークレイ, パージ  
ニア ストリート 2296
- ⑩発明者 ヤング, ジョン デイ. アメリカ合衆国, カリフォルニア 94596, ウォルナット クリー  
ク, ビエドラ ドライブ 1430